

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

Die Funktion und Pharmakologie der langsamen Nachhyperpolarisation
von Körnerzellen des Gyrus dentatus

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Debora Laker, geb. am 11.02.1987 in Bochum

aus Kritzmow

Rostock, 21.08.2017

Gutachter:

Prof. Dr. Timo Kirschstein, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Physiologie

Prof. Dr. Carola Haas, Universitätsklinikum Freiburg, Klinik für Neurochirurgie

Prof. Dr. Johannes Prudlo, Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Neurologie

Jahr der Einreichung: 2017

Jahr der Verteidigung: 2019

Solange das Gehirn ein Geheimnis ist, wird auch das Universum – als Widerschein
der Struktur des Gehirns – ein Geheimnis bleiben

Santiago Ramón y Cajal

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	IV
II.	ABKÜRZUNGEN	VI
III.	ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND FORMELVERZEICHNIS	VIII
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	DIE HIPPOCAMPUSFORMATION.....	1
1.1.1	<i>Anatomie</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Physiologie.....</i>	<i>4</i>
1.1.3	<i>Pathophysiologie</i>	<i>7</i>
1.2	IONENKANÄLE UND NEURONALE AKTIVITÄT	10
1.3	DIE LANGSAME NACHHYPERPOLARISIERUNG.....	15
1.3.1	<i>Die Physiologie des sAHPs.....</i>	<i>15</i>
1.3.2	<i>Die Funktion des sAHPs und die Pathophysiologie</i>	<i>19</i>
1.4	ZIELSETZUNG	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES SAHP-STROMS VON DG-KÖRNERZELLEN	22
2.1.1	<i>Präparation von akuten hippocampalen Hirnschnitten.....</i>	<i>22</i>
2.1.2	<i>Die Patch-Clamp-Methode</i>	<i>22</i>
2.1.3	<i>Die perforated Patch-Clamp-Methode</i>	<i>26</i>
2.1.4	<i>Pharmakologie.....</i>	<i>27</i>
2.1.5	<i>Uncaging von Calcium</i>	<i>28</i>
2.1.6	<i>Messprotokolle, Datenanalyse und Statistik.....</i>	<i>29</i>
2.1.7	<i>Kainat-Modell.....</i>	<i>31</i>
2.2	ETABLIERUNG DER KNOCK DOWN-TECHNIK.....	32
2.2.1	<i>Molekularbiologie.....</i>	<i>32</i>
2.2.2	<i>Organotypische Schnittkulturen</i>	<i>40</i>
2.2.3	<i>Der Gen-Transfer von DNA in organotypische Schnittkulturen</i>	<i>43</i>
2.2.4	<i>Immunohistochemie</i>	<i>45</i>
2.2.5	<i>Fluoreszenzmikroskopie.....</i>	<i>46</i>
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES SAHP-STROMS.....	47
3.1.1	<i>Eigenschaften von Körnerzellen</i>	<i>47</i>
3.1.2	<i>Die elektrophysiologische Messung des sAHP-Stroms</i>	<i>49</i>
3.1.3	<i>Der funktionelle Phänotyp ist abhängig vom sAHP-Strom</i>	<i>53</i>
3.1.4	<i>Der sAHP-Strom von Kainat-Körnerzellen</i>	<i>54</i>
3.2	DIE PHARMAKOLOGIE DES SAHP-STROMS VON KÖRNERZELLEN	55
3.2.1	<i>Der sAHP-Strom ist ein Kaliumstrom</i>	<i>55</i>
3.2.2	<i>Calcium-Abhängigkeit</i>	<i>56</i>
3.2.3	<i>Calcium-Quelle.....</i>	<i>60</i>
3.2.4	<i>Der sAHP-Strom wird durch die Adenylatzyklase moduliert</i>	<i>60</i>

3.2.5	<i>KCNQ-Kanäle sind am sAHP-Strom beteiligt</i>	61
3.2.6	<i>ATP-abhängige Kaliumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt</i>	62
3.2.7	<i>Der sAHP-Strom ist Natrium-abhängig</i>	63
3.2.8	<i>Spannungsabhängige Natriumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt</i> ..	64
3.2.9	<i>Natrium-abhängige Kaliumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt</i>	65
3.2.10	<i>Slack-Kanäle sind am sAHP-Strom beteiligt</i>	65
3.2.11	<i>Die ATP-abhängige Na⁺/K⁺-Pumpe und der Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) sind nicht am sAHP-Strom beteiligt</i>	66
3.2.12	<i>K_{ATP}- und KCNQ-Kanal Beteiligung am sAHP-Strom</i>	66
3.3	DIE ETABLIERUNG DER KNOCK DOWN-TECHNIK	68
3.3.1	<i>Transfektion des pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR via Lipofectamine</i> ...	70
3.3.2	<i>Präparation des pAd/CMV/EmGFP-miRTM</i>	72
3.3.3	<i>Der Adenovirus infiziert nur Gliazellen</i>	73
4	DISKUSSION	77
4.1	DER SAHP-STROM VON KÖRNERZELLEN	77
4.1.1	<i>Körnerzellen des Gyrus dentatus sind „burster“ und zeigen einen prominenten sAHP-Strom</i>	77
4.1.2	<i>Die Elektrophysiologie von DG-Körnerzellen im Kainat-Modell</i>	79
4.2	DER SAHP-STROM IST EIN CALCIUM-ABHÄNGIGER KALIUMSTROM	82
4.3	KCNQ-KANÄLE SIND AM SAHP-STROM BETEILIGT	85
4.4	ATP-ABHÄNGIGE KALIUMKANÄLE SIND AM SAHP-STROM BETEILIGT	87
4.5	DER SAHP-STROM IST ZUSÄTZLICH NATRIUM-ABHÄNGIG	89
4.6	DIE CALCIUM- UND NATRIUMABHÄNGIGKEIT DES SAHP-STROMS	90
4.7	MOLEKULARE DIVERSITÄT DER LANGSAMEN NACHHYPERPOLARISIERUNG .	91
4.8	ZUKÜNFTIGE KNOCK DOWN-EXPERIMENTE	95
4.9	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSSICHT	99
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	100
V.	ANHANG	101
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	104
VII.	DANKSAGUNG	129

II. Abkürzungen

ACSF *artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit*
 AED *antiepileptische Medikamente (engl. antiepileptic drugs)*
 AHP *Nachhyperpolarisations-Potential (engl. afterhyperpolarization)*
 BK *Calciumabhängiger Kaliumkanal mit großer Einzelkanalleitfähigkeit (engl. big conductance, calcium-activated potassium channel)*
 BME *engl. basal medium eagle*
 CA *Cornu Ammonis*
 CaCl₂ *Calciumchlorid*
 Ca_v *spannungsabhängiger Calciumkanal*
 cc *current clamp*
 C_m *Membrankapazität*
 CMV *Cytomegalovirus*
 CNQX *6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione*
 CPA *Cyclopiazonic Acid*
 CTRL *Kontrolllösung mit Standard-Ionenkanalblockern, siehe Tabelle 2*
 DAG *Diacylglycerine*
 DAPI *4',6-Diamidin-2-phenylindol*
 DG *Gyrus dentatus (engl. Dentate Gyrus)*
E.Coli *Escherichia coli*
 EC *entorhinaler Cortex*
 EGTA *Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure*
 emGFP *Emerald Green Fluorescent Protein*
 fAHP *schnelles AHP (engl. fast AHP)*
 FKS *fötales Kälberserum*
 GABA *Gamma-Amino-Buttersäure*
 GCD *Körnerzelldispersion (engl. granule cell dispersion)*
 GCs *Körnerzellen, engl. granule cells*
 HCN *engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*
 HM *Henry Gutsav Molaison*
 ILAE *International League Against Epilepsy*
 IP₃ *Inositol-1,4,5-trisphosphat*
 KA *Salz der Kainsäure (Kainat)*
 K_{Ca} *Calciumabhängige Kaliumkanäle*
 KCl *Kaliumchlorid*
 KGluc *Kaliumglukonat*
 K_{ir} *einwärts-gerichtete Kaliumkanäle (engl. inward rectifier)*
 KMeSO₄ *Kaliummethylsulfonat*
 K_v *spannungsabhängige Kaliumkanäle*
 LTP *Long Term Potentiation*
 mAHP *mittellang dauerndes AHP (engl. medium AHP)*
 MEM *Zellkulturmedium (engl. minimal essential medium)*
 MgCl₂ *Magnesiumchlorid*
 NaCl *Natriumchlorid*
 NaH₂PO₄ *Dinatriumhydrogenphosphat*
 NaHCO₃ *Natriumhydrogencarbonat*
 Na_v *spannungsabhängige Natriumkanäle*

NCX $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NGS normales Ziegen Serum (engl. normal goat serum)
N-Typ engl. neither (L- nor T-Type)
PB Phosphatpuffer
PCs Pyramidenzellen
PFU plaque forming units
PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP-5K phosphatidylinositol 4-phosphate 5-Kinase
PP engl. perforant path
pre-miRNA Vorläufer der miRNA, (engl. precursor-miRNA)
P-Typ P-Typ-Calciumkanal (Purkinje-Zellen)
R_{in} Eingangswiderstand (der messbare Gesamtwiderstand einer Zellmembran, engl. input resistance)
RNA Ribonukleinsäure
RNAi RNA Interferenz
rpm Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
R_{Seal} hochohmige Abdichtung
R_{ser} Serienwiderstand
sAHP das langsame, hyperpolarisierende Nachpotential (engl. slow afterhyperpolarization)
sAHP-Strom Ionenstrom der das sAHP produziert
SFA Adaption der Aktionspotentialfrequenz (engl. spike frequency adaptation)
SK Calciumabhängiger Kaliumkanal mit kleiner Einzelkanalleitfähigkeit (engl. small conductance, calcium-activated potassium channel)
TEA Tetraethylammonium
TLE Temporallappenepilepsie
TX Triton X
vc voltage clamp
ZNS zentrales Nervensystem

III. Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abb. 1: Lage des Hippocampus im Gehirn und die neuronalen Verschaltungen innerhalb der Struktur.....	2
Abb. 2: Die Plasmamembran als Kondensator.	12
Abb. 3: Schematische Einteilung der alpha-Untereinheiten von Kaliumkanälen anhand der Sequenzähnlichkeiten und Transmembrandomänen.	14
Abb. 4: Der funktionelle Phänotyp von Neuronen und die Nachhyperpolarisationen.	15
Abb. 5: Der elektrische Widerstand einer angepatchten Körnerzelle im <i>cell attached</i> - und im <i>whole cell</i> -Modus.	25
Abb. 6: Die Veränderung des Eingangswiderstandes während der Perforierung einer Zellmembran via Gramicidin.	26
Abb. 7: Die Ausmessung der maximalen sAHP-Stromamplitude.....	30
Abb. 8: Die Klonierung der miRNA-kodierenden Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA™6.2-GW/EmGFP miR.	35
Abb. 9: Die Klonierung der adenoviralen Plasmid-DNA.....	36
Abb. 10: Organotypische Schnittkulturen und ihre vitalen Eigenschaften.....	42
Abb. 11: Analyse des sAHP-Stroms, im Vergleich ACSF vs. CTRL und vc-Messung vs. cc-Messung.	49
Abb. 12: Der Vergleich von maximalen sAHP-Stromamplituden vor und nach Applikation der CTRL-Lösung.	50
Abb. 13: Aufzeichnungen des sAHP-Stroms und des Eingangswiderstandes im vc-Modus und unter Einsatz verschiedener Patchpipettenlösungen.....	52
Abb. 14: Die Beziehung zwischen dem funktionellen Phänotypen, aufgenommen im cc-Modus und dem sAHP-Strom, gemessen im vc-Modus.....	53
Abb. 15: Der sAHP-Strom von KA-Körnerzellen in ACSF- und CTRL-Lösung.....	55
Abb. 16: Die Strom-Spannungskurve zeigt, dass der sAHP-Strom ein Kaliumstrom ist.	56
Abb. 17: Der sAHP-Strom wird vollständig durch den Calciumkanalblocker Nickel blockiert.....	57
Abb. 18: Der sAHP-Strom unter Einfluss des HVA-Calciumkanalblockers Cadmium.	58
Abb. 19: Der L-Typ-Calciumkanalblocker Nifedipine hat keinen Einfluss auf den sAHP-Strom in Körnerzellen.	59
Abb. 20: Das Calcium-Uncaging führte zu einem Ionenausstrom mit sAHP-Strom-Kinetik.	59
Abb. 21: Die Blockierung der intrazellulären Calciumfreisetzung durch CPA hatte keinen Einfluss auf den sAHP-Strom.....	60
Abb. 22: Die Wirkung des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin auf die sAHP-Stromamplitude.	60
Abb. 23: Die Wirkung von XE991 und Retigabine auf die sAHP-Stromamplitude.	61
Abb. 24: Der Einfluss des K _{ATP} -Kanalblockers Tolbutamide und des Aktivators Diazoxide auf den sAHP-Strom.	63

Abb. 25: Die Wirkung einer Natrium-freien ACSF-Lösung auf den sAHP-Strom...	64
Abb. 26: Die Wirkung des Breitbandblockers Lidocain auf den sAHP-Strom.....	64
Abb. 27: Die Wirkung des K_{Na} -Kanalblockers Quinidine auf die sAHP-Stromamplitude von Körnerzellen.....	65
Abb. 28: Der Einsatz des Slack-Kanalblockers Bepridil führte zu einer Abnahme des sAHP-Stroms.....	65
Abb. 29: Die Blockade des Natrium-Calcium-Austauschers NCX bewirkte keine Veränderung des sAHP-Stroms.....	66
Abb. 30: Die Untersuchung des sAHP-Stroms in einem Stufenexperiment mit Einsatz von Tolbutamide, XE991 und Nickel.....	67
Abb. 31: Die Wirkung des K_{ATP} Blockers Tolbutamide auf den sAHP-Strom von Körnerzellen im OHSC und der funktionelle Phänotyp.....	69
Abb. 32: Klonierung des RNAi-kodierenden DNA-Plasmids pcDNA TM 6.1GW-miR-Kcnj11 und Transfer des Plasmids via Lipofectamine in organotypische Schnittkulturen.....	71
Abb. 33: Die Klonierung der miRNA-kodierenden DNA in die adenovirale DNA pAd/CMV/EmGFP-miR TM	73
Abb. 34: Infizierte Zellen im OHSC unter einem inversen Mikroskop zur Untersuchung der Elektrophysiologie.....	74
Abb. 35: Die Infektion von Zellen der OHSC mit dem Adenovirus Ad/CMV-GFP über die Tropfen-Methode und die Inkubation in einer Viruslösung.....	75
Abb. 36: Die Mikroinjektion des Adenovirus Ad/CMV-GFP in das GC-Band des <i>Gyrus Dentatus</i>	76
Abb. 37: Übersicht über die gemittelte, prozentuale Veränderung der sAHP-Amplitude während des Einflusses der getesteten Pharmaka in <i>perforated</i> Patch-Clamp-Experimenten.....	91
Abb. 38: Der potentielle, molekulare Mechanismus des sAHP-Stroms in einer schematischen Darstellung.....	94
 Tabelle 1: Patch-Clamp-Lösungen.....	 24
Tabelle 2: Die für die CTRL-Lösung verwendeten Ionenkanalblocker und Blocker von synaptischen Rezeptoren mit Angabe der Hersteller, der Endkonzentration und der Zielkanäle und -rezeptoren.....	27
Tabelle 3: Die für die sAHP-Stromuntersuchung verwendeten Substanzen mit Angabe des Herstellers, der Endkonzentration in der CTRL-Lösung (Tabelle 3) und der Zielkanäle. ↓= Blocker, ↑= Aktivator.....	28
Tabelle 4: Die miRNA-kodierenden Einzelstrang-Sequenzen (<i>top und bottom</i>) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP} -Untereinheit $K_{ir6.2}$ (Kcnj11) und an die KCNQ2-Untereinheit.....	34
Tabelle 5: Auflistung der DNA-Vektoren und der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen zur Selektion von positiven <i>E. coli</i> Klonen auf Agar Platten.....	38
Tabelle 6: Eine Auflistung der für die Plasmidisolation (Mini Präparation) verwendeten Lösungen.....	39

Tabelle 7: Auflistung der Zellkulturmedien für die Präparation und Kultivierung von OHSCs.	42
Tabelle 8: Die verschiedenen, eingesetzten DNA- und Lipofectamine™ 2000-Konzentrationen.	43
Tabelle 9: Drei verschiedene Methoden für die Applikation von Ansatz 3 auf die OHSC.	44
Tabelle 10: Die für die Injektion von OHSC eingesetzten Adenoviren mit Angabe des Virus Titers.	45
Tabelle 11: Widerstände, die zu Beginn eines Patch-Clamp-Experimentes gemessen wurden (n = 166).	47
Tabelle 12: Der mittlere Widerstand R_{in} , sowie die Membranzeitkonstante τ_m und das Ruhemembranpotential V_{rest} von naiven Körnerzellen (n = 166).	48
Tabelle 13: Die aktiven Parameter von Körnerzellen, gemessen im cc-Modus.	48
Tabelle 14: Die passiven und aktiven Eigenschaften von KA-Körnerzellen. Der p-Wert zeigt die statistische Signifikanz und wurde bei der Analyse der Eigenschaften von GCs im Vergleich von Kontroll- zu KA-GCs errechnet.	54
Tabelle 15: Elektrophysiologische Messparameter von durchgeführten Patch-Clamp-Messungen an organotypischen Schnittkulturen (OHSC) und Basis-Eigenschaften von Körnerzellen in OHSCs.	69
Tabelle 16: Die (pre-) miRNA-Einzelstrang Sequenzen (<i>top</i> und <i>bottom</i>) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten, welche über das Gen <i>Kcnj11</i> kodiert werden.	101
Tabelle 17: Tabelle 18: Die (pre-)miRNA-Einzelstrang Sequenzen (<i>top</i> und <i>bottom</i>) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten, welche über das Gen <i>Kcnj8</i> kodiert werden.	102
Tabelle 19: Die (pre-)miRNA-Einzelstrang Sequenzen (<i>top</i> und <i>bottom</i>) zur Bindung an die mRNA der <i>Kcnq2</i> -Untereinheiten.	102
Tabelle 20: Die miRNA-Einzelstrang Sequenzen (<i>top</i> und <i>bottom</i>) zur Bindung an die mRNA der <i>Kcnq3</i> -Untereinheiten.	103
Formel I: Nernst-Gleichung.	12
Formel II: Ohm'sches Gesetz.	30

1 Einleitung

1.1 Die Hippocampusformation

Das Gehirn bestimmt wie wir fühlen, sehen, hören und handeln. Dass wir all die aufgenommenen Informationen auch in Erinnerung behalten und miteinander verknüpfen können, haben wir zu einem großen Teil dem Hippocampus zu verdanken. Der Hippocampus ist eine Struktur im zentralen Nervensystem (ZNS), die beim Menschen beidseitig im Bereich der Schläfen im sogenannten Temporallappen lokalisiert ist. Hier kommen die afferenten Signale im Wesentlichen aus den sensorischen Gehirnregionen, aber auch aus dem Hypothalamus, dem Hirnstamm und aus Teilen des limbischen Systems, welches ebenso den Hippocampus umfasst (Andersen et al., 2007). Im Hippocampus werden sie sortiert, gefiltert und nur die relevanten Informationen prozessiert an das Großhirn weitergegeben. Somit wird das episodische Langzeitgedächtnis produziert, welches uns persönliche Erinnerungen wieder abrufen lässt.

Die Erstdokumentation des Hippocampus durch den venezianischen Anatom Julius Caesar Arantius (*Giulio Cesare Aranzi*) im 16. Jahrhundert beschreibt einen historischen Moment in der Geschichte der Neurowissenschaften (Bir et al., 2015). Arantius war es, der dieser Gehirnregion den Namen Hippocampus verlieh. Hippocampus bedeutet übersetzt ‚Seepferdchen‘ und weist auf die außergewöhnliche Form der Gehirnregion hin. Nachdem Camillo Golgi im Jahr 1886 dann mit seiner Silberfärbung die faszinierende dreischichtige Struktur des Hippocampus für jedermann sichtbar machte, wurde schnell ersichtlich, dass es sich hier um eine hochinteressante Gehirnstruktur handelte. Der Hippocampus gehört als Teil des limbischen Systems zum Archicortex und ging damit aus dem Archipallium (griech. Arche ‚Anfang‘, latein. Pallium ‚Mantel‘) hervor, welches sich bereits früh in der stammesgeschichtlichen Zeitleiste ausdifferenzierte. Dadurch ist die anatomische und zytoarchitektonische Form des Hippocampus hochkonserviert und weicht bei verschiedenen Säugetierspezies nicht stark voneinander ab (Andersen et al., 2007).

Methodisch sind bei der Erforschung des Hippocampus die drei Bereiche: Anatomie, Physiologie und Pathologie zu unterscheiden.

1.1.1 Anatomie

Anatomisch erstreckt sich der Hippocampus bilateral von den rostral gelegenen, septalen Nuclei bis nach caudal zu den Temporallappen (Andersen et al., 2007). Strenggenommen umfasst nur die Hippocampusformation den *Gyrus dentatus* (engl. *dentate gyrus*, DG), das Ammons Horn (latein *Cornu ammonis*, CA) und das Subiculum (Abb. 1). Der Begriff Hippocampus, welcher eigentlich nur das Ammonshorn beschreibt, wird der Einfachheit halber oft (wie auch in der vorliegenden Arbeit) für den DG mitverwendet. 1911 konnte

der spanische Mediziner und Nobelpreisträger Ramón y Cajal bereits mithilfe der Golgi Färbung, die wichtigsten Zelltypen und Verbindungen im Gehirn inklusive des Hippocampus herausarbeiten (Cajal, 1911). Im Gegensatz zu dem sechsschichtigen Isocortex besteht der Hippocampus aus vier Zellschichten: den Pyramidenzellschichten CA1-CA3 und der Körnerzellschicht (Abb. 1).

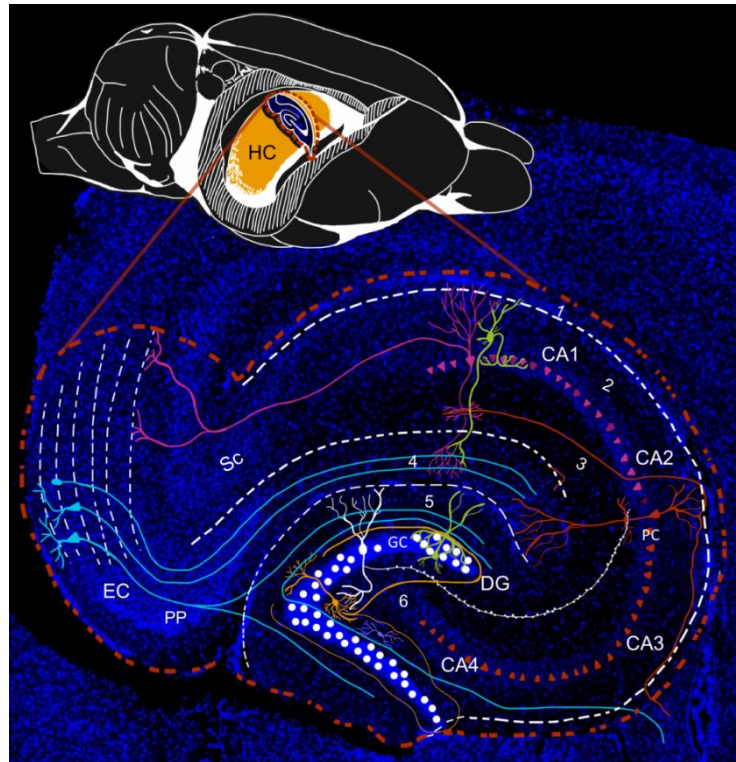


Abb. 1: Lage des Hippocampus im Gehirn und die neuronalen Verschaltungen innerhalb der Struktur. Die Zeichnung des Mausgehirns zeigt die Lage des Hippocampus (HC) bei abgetragener Cortexschale. Der HC liegt in gebogener Form im Temporallappen. Der Querschnitt zeigt vergrößert die verschiedenen neuronalen Verschaltungen in einem Fluoreszenzbild. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Der Hippocampus besteht aus dem *Gyrus Dentatus* (DG) und den verschiedenen Bereichen des *Cornu Ammonis* (CA). Im DG kommen die Afferenzen des *perforant path* (PP) aus dem Entorhinalen Cortex (EC) an und verschalten auf die Dendriten der Körnerzellen (GC, weiß), welche im *Stratum moleculare* (5) liegen. Außerdem gibt es noch direkte Efferenzen aus dem EC, welche im *Stratum lacunosum* (4) Synapsen mit den PCs (PC) bilden. Die Somata der GCs befinden sich im GC-Band und werden korbformig von den Dendriten der Korbzellen (grün) umgeben, deren Somata im Hilus (6) lokalisiert sind. Die GCs senden ihre Moosfasern zu den PCs (rot, pink) und bilden dort synaptische Kontakte aus. Die apikalen Dendriten der PCs liegen im *Stratum oriens* (2), die basalen im *Stratum radiatum* (3). Die PCs bilden die Efferenzen zurück zum EC. Der Alveus (1) umgibt den Hippocampus und grenzt diesen vom Seitenventrikel ab. Eigene Darstellung nach der Vorlage von (Amaral & Witter, 1989).

Die afferenten Eingänge. Aus dem entorhinalen Cortex (EC) kommen die Informationen unidirektional über den *Tractus perforans* (engl. *perforant path*, PP) im Hippocampus an und projizieren auf die glutamatergen Körnerzellen (GCs) des DG (Amaral & Witter, 1989; Witter, 2007). Die vom PP innervierten Dendriten der GCs liegen im *Stratum moleculare*, der Molekularschicht und enden im Zellsoma, welches im *Stratum granulare*, der dichten Körnerzellschicht liegt.

Körnerzellen. Die GCs sind aus morphologischer Sicht sonderbar. Ihre Axone, die Moosfasern, besitzen große Verdickungen und filopodische Ausläufer, die den Moosfasern ihren Namen geben (Claiborne et al., 1990). Zudem formen sie, abhängig von der postsynaptischen Zelle, auffällig große und starke Synapsen („*detonator synapses*“) aus (Henze et al., 2002). Die vielen Kollateralen der Moosfasern verzweigen sich und innervieren vielfach die unterschiedlichen Zellen im Hilus (auch CA4 genannt, siehe Abb. 1), während der Hauptstrang auf die apikalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen (PC) und lokale Interneurone projiziert. In der Körnerzellschicht befinden sich außerdem verschiedene Typen inhibitorischer (GABAerger) Interneurone, z.B. die Korbzellen (engl. *basket cells*), welche hauptsächlich an der Grenze zum Hilus liegen und die GCs synaptisch wie ein Korb umschließen (Ribak & Seress, 1983). Teilweise stehen die Korbzellen ebenfalls mit den Axonen des PP in Verbindung und führen somit auch zu einer Vorwärtshemmung. Diese lässt sich von der Rückwärtshemmung abgrenzen, bei der GCs Korbzellen aktivieren, die wiederum GCs hemmen (Ribak, 1992).

Der Hilus. Der Hilus ist eine polymorphe Zone in welcher der prominenteste Zelltyp die exzitatorische Mooszelle ist, die u.a. Signale von den Moosfasern empfängt (Scharfman & Myers, 2012). Mooszellen selbst innervieren GABAerge Interneurone und projizieren zurück auf Interneurone und GCs des DG und bilden damit einen *feedback*-Mechanismus aus (Jackson & Scharfman, 1996; Scharfman & Myers, 2012).

Cornu Ammonis. Der DG umgibt C-förmig das entgegengesetzte ebenfalls C-förmige *Cornu Ammonis* (latein ‚Ammons Horn‘), welches sich nach Lorente de Nó (1934) zytoarchitektonisch in vier Regionen unterteilt: das CA1-, CA2-, CA3- und CA4-Band, wobei die Existenz des CA4-Bandes umstritten ist (Amaral et al., 2007). Der Teil des DG, der zwischen CA3- und CA1-Band liegt, wird der suprapyramidale DG genannt, der Teil unter dem CA3-Band wird als infrapyramidales Band bezeichnet.

Pyramidenzellen. Im *Cornu Ammonis* liegt die höchste Zellkörperdichte im *Stratum pyramidale*, der Pyramidenzellschicht (Cassell & Brown, 1977). Hier befinden sich größtenteils glutamaterge PCs, aber auch Interneurone. Die Apikaldendriten der PCs bilden das *Stratum radiatum*. Zwischen dem *Stratum radiatum* und dem *Stratum pyramidale* liegt eine schmale Schicht, das *Stratum lucidum*. Hier verschalten die Moosfasern der GCs auf die proximalen Dendriten der PCs, welche große Dendritenfortsätze (engl. *spine*) besitzen (Blackstad et al., 1970). Das *Stratum oriens* liegt zwischen *Stratum pyramidale* und dem Alveus, welcher an die Wand des dritten Ventrikels grenzt. Im *Stratum oriens* befinden sich die apikalen Dendriten der PCs, sowie Interneurone wie die Korbzellen, die ein synaptisches Netz um die Somata der PCs bilden. Das Subiculum verbindet den Hippocampus und die parahippocampale Hirnrinde (*Gyrus parahippocampalis*) und besteht neben dem *Stratum pyramidale* und dem *Stratum oriens*, aus dem *Stratum moleculare*, welches Axonbündel, Dendriten und Interneurone umfasst und u.a. die synaptischen Verbindungen zwischen den Schaffererkollateralen und den apikalen Dendriten lokaler PCs enthält. Die Schaffererkollaterale sind eine Faserbahn, die

von den CA3-PCs ausgehend auf die CA1-PCs projizieren und mit der Integration von Erinnerungen im Zusammenhang stehen (Szirmai et al., 2012).

Der Ausgang. Der Alveus besteht aus weißer Substanz und enthält somit die Efferenzen aus dem Hippocampus und Subiculum, welche zum Hypothalamus, zu der Amygdala, zum Frontallappen und zum *Nucleus ambiguus* weitergeleitet werden (Konrad et al., 2009). Somit ergibt sich ein Informationsfluss vom EC über das Körnerzellband zu den PCs der CA-Region. Von dort aus gelangt die Information in das Subiculum und über den Alveus in den Isocortex.

1.1.2 Physiologie

Bei der Erforschung der funktionellen Ebene des Gehirns lag die Aufmerksamkeit der Neurowissenschaftler bis Anfang des 20. Jahrhunderts eher auf der Großhirnrinde (lat. Cerebrum), da tiefer liegende Strukturen im lebenden Organismus bis dahin noch nicht erreichbar waren. Daher wurde aufgrund der vermeintlichen Entdeckung einer direkten Verbindung der *Bulbi olfactori* (deut. ‚Riechkolben‘) zum Hippocampus lange angenommen, dass dem Hippocampus hauptsächlich eine olfaktorische Funktion zukommt (Brodal, 1947).

Erst im Jahr 1937 stellte James W. Papez die primär olfaktorische Funktion aufgrund der Zuordnung des Hippocampus zum limbischen System in Frage, welche dem Hippocampus eher einen funktionellen Anteil an der Entstehung von Emotionen zukommen lässt (Papez, 1995). Er beschrieb den *Papez-Kreis* im limbischen System, welcher den Hippocampus, die Mamillarkörper, den Thalamus und den *Gyrus cinguli* umfasst und emotionale Erinnerungen festigt. Unterstützt wurde er von Alf Brodal im Jahr 1947, der keine direkte Verbindung zwischen dem *Bulbus Olfactorius* und dem Hippocampus finden konnte (Brodal, 1947).

Gedächtnis und Lernen. Erste Hinweise, dass der Hippocampus eine große Rolle in der Gedächtniskonsolidierung und dem Lernprozess spielt, gab es bereits schon mit der Untersuchung des *Wernicke-Korsakov-Syndroms* in den 1880er Jahren und weiteren Autopsien im Zusammenhang mit Gedächtnisdefiziten Anfang 1900 (Aggleton, 2014; Hayes et al., 2012; Zubaran et al., 1997). Jedoch wurde der Stellenwert der Beobachtung erst in den 1950er Jahren durch den Fall des an Epilepsie erkrankten Patienten Henry Gustav Molaison (HM) erkannt. HM verlor durch eine operative Resektion von Teilen beider medialer Temporallappen, auch zwei Drittel seiner Hippocampi und erlitt dabei zusätzlich eine starke Schädigung des noch vorhandenen Hippocampus und des ECs. Die epileptischen Anfälle waren daraufhin zwar eingedämmt, jedoch musste er von da an mit einer schweren anterograden Amnesie leben. Er konnte somit keine neuen Ereignisse mehr im Langzeitgedächtnis abspeichern (Corkin, 2002; Scoville & Milner, 1957). Bis in die 70er Jahre wurden viele Verhaltensstudien mit Läsionen oder Resektionen (Hippocampektomie) des Hippocampus von Tieren durchgeführt, aber auch mit ersten implantierten Mikroelektroden *in vivo*. In diesen Studien zeigten die Tiere häufig gravierende Lern- und Gedächtnisschwierigkeiten (Ross et al., 1984). Die Technik der

implantierten Mikroelektroden führte dann auch zu der Entdeckung des neuronalen Mechanismus, der höchstwahrscheinlich zu dem Lernvorgang führt. Im Jahr 1966 stellten Per Andersen und Terje Lømo fest, dass extrazellulär gemessene, postsynaptische Potenziale in der DG-Molekularschicht dauerhaft erhöht waren, wenn vorübergehend eine sehr starke, hochfrequente (tetanische) Stimulation erfolgte (Andersen et al., 1966; Lomo, 1966). Diese Entdeckung entsprach auch der von Donald Olding Hebb im Jahr 1949 postulierten Theorie über die Verstärkung einer Verbindung zweier Neurone, die häufig gemeinsam aktiv sind. 1973 wurde zudem eine Erhöhung von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) nach der tetanischen Stimulation des PP festgestellt und es wurden zwei Mechanismen für die Langzeitpotenzierung (LTP, engl. *long time potentiation*) herausgestellt: zum einen eine erhöhte Effektivität der Neurotransmission an PP-Synapsen und zum anderen eine erhöhte Exzitabilität von GCs. Bereits im Jahr 1967 vermuteten Andersen und Lømo eine Verbindung zwischen LTP und dem Lernprozess (Andersen & Lømo, 1967; Lømo, 2003). Ob LTP auch wirklich den neuronalen Mechanismus für den Lernprozess darstellt wurde lange Zeit diskutiert (Martin & Morris, 2002). Viele Studien zeigten Korrelationen zwischen LTP und Lernen (Izquierdo et al., 2008; Whitlock et al., 2006). 2006 konnte die Theorie durch ein Experiment von Pastalkova, in welchem LTP rückgängig gemacht und damit die Erinnerung an eine räumlichen Information ausgelöscht wurde, stark unterstützt werden (Pastalkova et al., 2006).

place cells. O'Keefe und Dostrovsky stellten die Theorie der kognitiven Karte, die der Navigation dienen soll, auf (O'Keefe & Dostrovsky, 1971). Sie verwendeten eine extrazelluläre Mikroelektrode, welche die Aufzeichnung von Aktivitäten eines individuellen Neurons in einer sich frei bewegenden Ratte erlaubte und stellten fest, dass einige Neurone nur feuerten, wenn die Ratte sich an einer spezifischen Lokalisation im Raum befand. Diese Neurone, welche bisher in der CA1- und CA3-Region, sowie im DG entdeckt werden konnten, nannten sie *place units* (Jung & McNaughton, 1993; O'Keefe, 1976). Im Jahr 2004 und 2005 wurden dann die zugehörigen *grid*-Zellen im EC gefunden, welche Informationen über die Richtung und Geschwindigkeit einer Bewegungsausführung im Raum an die *place*-Zellen weiterleiten (Fyhn et al., 2004; Hafting et al., 2005). Die Theorie der räumlichen Karte ist nun weitgehend anerkannt und immer noch Gegenstand der Erforschung (Ekstrom et al., 2003; Nadel, 1991). Im Jahr 2014 erhielten John O'Keefe, sowie Edward und May-Britt Moser für die Entdeckung der *place*- und *grid*-Zellen den Nobelpreis für Medizin.

Kognition. Der Hippocampus wurde außerdem mit weiteren Gehirnfunktionen, wie dem Angstverhalten (Engin & Treit, 2007), der Stressregulation (de Kloet, 1999; Veena et al., 2011) und sensomotorischen Funktionen (Bast & Feldon, 2003; Vanderwolf & Cain, 1994) in Zusammenhang gebracht.

Der Gyrus dentatus und seine Filterfunktion. Der DG hat mit seiner Lage im Hippocampus, als Empfangsstruktur für die meisten afferenten Fasern aus dem Cortex zum Hippocampus *proper* (CA), und seiner Fähigkeit zur Neurogenese, sowie zur Zellproliferation eine besondere Stellung im Hippocampus. Als Joseph Altman 1965 die

Eigenschaft zur Neurogenese im Hippocampus und *Bulbus olfactorius* mittels [^3H]-Thymidin-Autoradiographie entdeckte, war die allgemeine Anerkennung seines Experimentes noch nicht groß (Altman & Das, 1965). Auch nachdem die Experimente von Kaplan mithilfe der Elektronenmikroskopie im Jahr 1977 das Ergebnis bestätigten, dauerte es noch mehr als ein Jahrzehnt bis die Aufmerksamkeit auf die adulte Neurogenese gelenkt und diese allgemein akzeptiert wurde (Kaplan & Hinds, 1977).

Pattern separation. Nach Rolls und Kesner können dem DG drei wesentliche Funktionen zugeteilt werden (Kesner, 2007; Kesner & Rolls, 2015). Erstens die Funktion verschiedenste, sensorische Informationen aus dem vestibulären, olfaktorischen, visuellen und auditorischen System, welche den DG über den perirhinalen und lateralen EC erreichen, mit denen von den *grid*-Zellen über den medialen EC eintreffenden räumlichen Informationen, zu verbinden (Hafting et al., 2005). Zweitens die Trennung von eingehenden Informationsmustern (engl. *pattern separation*) dahingehend, dass ähnliche Eingänge voneinander abgegrenzt werden können und Interferenz reduziert wird (Berron et al., 2016; McHugh et al., 2007; O'Reilly & McClelland, 1994; Treves & Rolls, 1994). Und drittens die Verstärkung der ausgewählten Informationen und die effektive Einspeisung dieser via hebbischen Modifizierungen in das CA3-System (Lee & Kesner, 2004). Neuere optogenetische Untersuchungen geben jedoch noch zusätzlich Hinweise auf eine Funktion bei der Gedächtnisbildung (Liu et al., 2012; Ramirez et al., 2013) und der *pattern completion*, einer Eigenschaft die dahin der CA3-Region zugeteilt wurde und den Abruf von komplexen Informationen aus einer spärlichen Anzahl von Eingängen erlaubt (Kropff et al., 2015; Nakashiba et al., 2012; Temprana et al., 2015).

Folgende Eigenschaften des DG könnten hypothetisch zur *pattern separation* beitragen. Zum einen eine starke, kompetitive Modifizierung der PP-DG Synapsen nach Hebbischer Regel, die dafür sorgt, dass nur die Verbindungen bestehen bleiben, bei denen die zugehörigen Neurone eine besonders hohe Aktivität zeigen und auch nach negativer *feedback*-Hemmung noch aktiv sind (Bliss & Lømo, 1973; Rolls, 2007). Überlappende oder sehr ähnliche Informationen könnten außerdem durch die zahlreichen und rekurrenten Kontakte zu Interneuronen voneinander getrennt werden um eine Interferenz zu vermeiden (Myers & Scharfman, 2009). Weiterhin lässt die Tatsache, dass GCs kaum Projektionen untereinander aufweisen, sich aber über GABAerge Interneurone stark inhibieren und, in Relation zu benachbarten Regionen, in sehr großer Anzahl auftreten, auf eine sehr effiziente Muster-Diskriminationsfähigkeit schließen (de Almeida et al., 2009; Kropff et al., 2015; Leutgeb et al., 2007). Jede einzelne Körnerzelle hat nur relativ wenige Kontakte zu den PCs der CA3-Region. Da diese aber durch effiziente und modifizierbare Synapsen gebildet werden, kann eine einzelne Körnerzelle gleich mehrere CA3-Neurone über die Aktionspotential (AP)-Schwelle hinaus depolarisieren (Henze et al., 2002). Darüber hinaus hat wahrscheinlich auch die Neurogenese einen Einfluss auf die Informationen, die in die CA3-Region eingespeist werden (Nakashiba et al., 2012; Sahay et al., 2011). Durch diese werden nämlich während des Lernvorgangs neue Zusammenstellungen von möglichen Verbindungen präsentiert, die ein Aktivitätsmuster verstärken oder aber völlig neu entstehen lassen können.

Sparse coding. Um der Filterfunktion gerecht zu werden und nur spärliche, unabhängige Informationen (engl. *sparse coding*) an die CA3-Region weiterzuleiten, dürfen GCs des DG nicht zu viele APs generieren. Tatsächlich sind die Neurone im DG relativ ruhig im Vergleich zur CA-Region (Jung & McNaughton, 1993; Skaggs et al., 1996). Verantwortlich dafür wird v.a. die *feedback-feedforward*-Inhibition durch Interneurone gemacht, aber es wurde ebenso das negative Membranpotential von GCs in Betracht gezogen (Chawla et al., 2005; Kowalski et al., 2016; Neunuebel & Knierim, 2014; Temprana et al., 2015; Treves et al., 2008). Ob andere intrinsische Eigenschaften der GCs einen Anteil an dem *sparse coding* haben wird noch diskutiert (Kowalski et al., 2016; Yim et al., 2015).

Die intrinsischen Eigenschaften von Körnerzellen und die langsame Nachhyperpolarisierung. Wie oben erwähnt, wurde v.a. das sehr negative Ruhepotential zu den Mechanismen gezählt, die die neuronale Aktivität der GCs klein halten. Bei einem *in vivo*-Membranpotential im Bereich von -65 bis -84 mV, welches in Relation zu dem Potential von PCs sehr negativ ist, wird eine stärkere Depolarisation der Zellmembran benötigt um den Schwellenwert für ein AP (Kapitel 1.2) zu erreichen (Lambert & Jones, 1990; Penttonen et al., 1997; Spruston & Johnston, 1992; Staley & Mody, 1992; Ylinen et al., 1995). Andererseits ist der Vergleich mit den PCs nur bei gleichem Membranwiderstand gültig und der Eingangswiderstand von GCs ist sehr viel höher als der von PCs (Spruston & Johnston, 1992; Young et al., 2009). Weiterhin hätten alle Formen eines intrinsischen, negativen *feedbacks* in Form eines Nachhyperpolarisations-Potentials (AHP, Kapitel 1.3) bremsende Wirkung und müssen deshalb auch berücksichtigt werden. Für die DG-GCs existieren widersprüchliche Ergebnisse was die Ausprägung des AHPs und der damit zusammenhängenden AP-Entladungscharakteristik angeht. So beschreiben einige Studien eine tonische bis adaptierende AP-Entladung (Dietrich et al., 1999; Dietrich et al., 2005; Isokawa et al., 1991; Krueppel et al., 2011; McDermott & Schrader, 2011; Mongiat et al., 2009; Podlogar & Dietrich, 2006; Schmidt-Hieber et al., 2004; Spruston & McBain, 2006; Staley et al., 1992; Young et al., 2009) während andere Studien, die hauptsächlich *in vivo*-Experimente beschreiben, eher von so genannten *bursts* (deutsch ‚sich entladen‘) sprechen (Jung & McNaughton, 1993; Pernia-Andrade & Jonas, 2014). Bei einem *burst* erfolgt initial eine kurze Abfolge von APs mit einer anschließenden langen Pause. Die verschiedenen AP-Entladungscharakteristiken werden in Kapitel 1.2 detaillierter erklärt. Das AHP besteht aus drei Komponenten (Kapitel 1.3), wobei angenommen wird, dass die langsame Nachhyperpolarisierung (engl. *slow afterhyperpolarisation*, sAHP) durch einen Calcium-abhängigen Kaliumstrom generiert wird. Das sAHP könnte die GCs vor einer Hyperaktivität, sowie das *Cornu Ammonis* vor einem unkontrollierten Signaleingang schützen. Genau diese Eigenschaft wird im Fall von epileptischen Anfällen dringend benötigt und ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1.3 Pathophysiologie

Der Hippocampus ist in viele Störungen und Erkrankungen des Gehirns involviert. Meist ist der Hippocampus dabei jedoch nicht der Auslöser, sondern wird sekundär

beeinträchtigt. So wurden hippocampale Schädigungen bereits in Assoziation mit Stress, Depressionen, Schizophrenie, Epilepsie, der Alzheimer-Krankheit, Ischämie bzw. Hypoxie, Traumata und Hypoglykämie festgestellt (Ball, 1977; Campbell & Macqueen, 2004; Gothelf et al., 2000; Margerison & Corsellis, 1966; McNay et al., 2006; Nikonenko et al., 2009; Tate & Bigler, 2000). Die häufigsten auftretenden neurologischen Erkrankungen sind die Alzheimer-Krankheit und Epilepsie, hier allen voran die Temporallappenepilepsie (TLE). Bei diesen Erkrankungen ist der Hippocampus meist schweren pathologischen Veränderungen ausgesetzt und trägt damit, so wird vermutet, zur Manifestation der Erkrankungen bei.

Epilepsie. Die Epilepsieerkrankung wird von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (engl.: *International League Against Epilepsy*; ILAE) konzeptuell als eine Störung im Gehirn definiert, die durch die andauernde Prädisposition epileptische Anfälle zu generieren, die assoziierten neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen, charakterisiert ist und das Auftreten von mindestens einem Anfall impliziert (Fisher et al., 2014). Ein epileptischer Anfall ist das zeitweise Auftreten von neuronalen Spontanentladungen, welche je nach Anfallsursprung zu motorischen, sensiblen oder vegetativen Verhaltens- und/oder Befindensstörungen führen können. Seit 1989 werden Epilepsien durch die ILAE nach bestimmten Anfallsformen klassifiziert. Ein Kriterium dabei ist die Zuordnung in generalisierte Anfälle, die simultan im gesamten Gehirn entstehen, und lokalisationsbezogene (Partial-) Anfälle. Die Partialepilepsie macht rund 60% aller Epilepsieerkrankungen aus und wird nach den Ursprungsorten der Anfälle unterteilt.

Die Temporallappenepilepsie. Die Temporallappenepilepsie (TLE) zählt zu den am häufigsten auftretenden Anfallsformen der partiellen Epilepsien. In über 50% der Fälle sprechen die Patienten während einer Therapie nicht auf antikonvulsive (= „antiepileptische“) Medikamente (engl. *antiepileptic drugs*; AED)¹ an, so dass bei schweren Formen häufig nur noch ein chirurgischer Eingriff bleibt (Tellez-Zenteno & Hernandez-Ronquillo, 2012). TLE-Anfälle äußern sich anfangs häufig durch eine Aura (z.B. eine epigastrische Aura) und einen kurzen Bewegungsstillstand mit abwesendem Verhalten, gefolgt von einem zwei- bis dreiminütigen automatisierten Verhalten, welches häufig ipsilaterale Bewegungen mit dem Mund oder Händen und Füßen impliziert. In manchen Fällen gehen sie in eine komplexe Form mit Bewusstseinsverlust über.

Ursachen der TLE. Dass der Hippocampus in den Krankheitsverlauf der TLE involviert ist, wurde erstmals durch den deutschen Arzt Wilhelm Sommer im Jahr 1880 beschrieben. Er untersuchte 90 *postmortem* entnommene Hippocampi und stellte dabei den Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen im Hippocampus und der Manifestation der Epilepsie-Erkrankung heraus (Thom, 2014). Heute wird angenommen, dass der Hippocampus der Ursprungsort und somit der Generator der TLE ist, da die chirurgischen Resektionen der sklerotischen Hippocampus-Anteile (s.u.) in 80% der Fälle

¹ AEDs werden zwar als „antiepileptisch“ bezeichnet, heilen die Epilepsie jedoch bisher noch nicht, sondern dämpfen nur Anfälle ein.

zu einer Verminderung der epileptischen Anfälle in Anzahl und Schwere führen (Arruda et al., 1996). Aus diesem Grund lag der Fokus der TLE-Forschung eher auf dem Hippocampus als auf dem EC, der als mögliche Quelle der TLE-Anfälle damit aber nicht ausgeschlossen ist. Unabhängig vom Entstehungsort sind die Ursachen für epileptische Aktivitäten vielfältig und können u.a. in Fehlfunktionen von Ionenkanälen liegen, die durch Mutationen, Verletzungen des Gehirns oder Umwelteinflüssen zustande kommen.

Zu den Veränderungen, die in epileptischen Hippocampi beobachtet werden konnten, gehören die hippocampale Sklerose und die Körnerzelldispersion, die im Folgenden beschrieben werden.

Hippocampale Sklerose. Der zuvor erwähnte Arzt Wilhelm Sommer fand bereits bei ersten Untersuchungen an epileptischen Hippocampi ein verstärktes Zellsterben und eine Einwanderung von Gliazellen (Sklerose = Narbenbildung), insbesondere in der CA1-Region vor, welche in dem Epilepsiekontext seither auch als Sommer-Sektor bezeichnet wird. Heute ist bekannt, dass es zu einem selektiven Zellsterben in dem erwähnten Sommer-Sektor und dem Hilus kommt und der so gewonnene Platz von Gliazellen eingenommen wird. Die PCs der CA3-Region und die DG-GCs hingegen, scheinen resistenter zu sein und sind erst bei sehr starker hippocampaler Sklerose (HS) betroffen (Wyler et al., 1992). Im Hilus kommt es sowohl zu einem Prinzipalzellsterben, wie auch zu einem Absterben von Interneuronen. Für die neuropathologische Evaluierung wird das Ausmaß des neuronalen Zellverlustes seit 1992 in fünf unterschiedliche Grade (0-4), auch Wyler Grade genannt, unterteilt (Wyler et al., 1992). Die HS kommt in etwa 50% der TLE-Fälle vor und ist vor allem pathologischer Bestandteil bei der pharmakoresistenten Epilepsie (Thom et al., 2010).

Körnerzelldispersion. Neben dem Zellverlust und der Gliose gibt es noch weitere anatomische Veränderungen im epileptischen Hippocampus. In Korrelation mit der Schwere des neuronalen Zellverlusts, kommt es zu einer Körnerzellwanderung (engl. *granule cell dispersion*, GCD) und außerdem zu einer Moosfasersprossung in die Molekularschicht (Houser, 1990; Sutula et al., 1989). Zudem zeigen die GCs eine veränderte Zellmorphologie (Houser, 1992; von Campe et al., 1997). Hierfür ist wahrscheinlich der Verlust von Reelin-produzierenden Zellen verantwortlich, denn Reelin hält die GCs in ihrem schmalen Band (Haas & Frotscher, 2010; Orcinha et al., 2016). Zusätzlich wurde in einem anderen TLE-Tiermodell eine erhöhte Neurogenese festgestellt, wobei ein Teil der neu entstandenen GCs sogar bis in die CA3-Region einwandern (Parent et al., 1997). Durch diese abnormen Zustände und den Verlust von Zielzellen, werden andere Zellen von den Moosfasern innerviert als im gesunden Hippocampus. Die Moosfasern projizieren teilweise sogar wieder zurück auf Körnerzellsomata. Die abnormalen neuronalen Verbindungen könnten zu *feedback*- und *feedforward*-Exzitationen führen, die wiederum zur Anfallsentstehung beitragen könnten (Parent et al., 1997).

DG und TLE. Die oben genannten Veränderungen wurden lange als Schlüsselement zur Etablierung einer chronischen Epilepsie angesehen und rückten den Fokus der Forschung

auf die Rolle des DG in der Pathophysiologie von TLE (Heinemann et al., 1992; Hsu, 2007; Krook-Magnuson et al., 2015; Lothman et al., 1992). Heute gibt es mehrere Theorien zur Anfallsentstehung im Hippocampus, die größtenteils in Verbindung mit dem DG stehen. Darunter fallen die *mossy-fiber-sprouting*- (Dudek & Shao, 2004), die *dormant basket cell*- (Scharfman & Bernstein, 2015) und die Interneuron-Hypothese (Dudek & Shao, 2003; Kobayashi & Buckmaster, 2003). Die Beobachtungen einer Übererregbarkeit von epileptischen GCs im DG stützen die Hypothesen einer Anfallsentstehung im DG (Coulter, 2000; de Lanerolle et al., 2003; Dietrich et al., 1999; Hester & Danzer, 2014; Jinde et al., 2012; Magloczky et al., 1997; Mehranfard et al., 2014; Selke et al., 2006; Sloviter, 1987). Jedoch gibt es auch deutliche Hinweise, die dem DG mit seinen GCs statt dem proepileptischen Status, eher eine Schutzfunktion zukommen lassen. So wurde im TLE-Tiermodell und in operativ entfernten Hippocampi von TLE-Patienten, sogar eine erniedrigte Erregbarkeit beschrieben (Kirchheim et al., 2013; Stegen et al., 2009; Young et al., 2009).

EC-CA1 und TLE. Die Annahme, dass epileptische Aktivität nicht direkt durch die EC-DG Verbindung in den Hippocampus gelangt, könnte durch eine Studie aus dem Jahr 2006 gestützt werden, welche die direkten afferenten Fasern vom EC in die CA1-Region in Augenschein nimmt. Diese zeigt, dass im Pilocarpin TLE-Modell die *feedforward*-Hemmung durch den Verlust von Neuronen im EC, die auf CA1-Neurone projizieren, und von Interneuronen im *Stratum oriens lacunosum* wegfällt und die exzitatorische Verbindung dadurch eine 10-fach erhöhte Effektivität erhält (Ang et al., 2006). Dieser Umstand bzw. die niedrige Erregbarkeit von GCs, könnte die Erklärung für das Überleben von GCs und CA3-PCs und das starke Zellsterben von PCs im Sommersektor bei der TLE sein.

Epilepsie und Ionenkanäle. Es wird ersichtlich, dass die Ursachen für die Entstehung von epileptischen Anfällen und vor allem der Manifestation einer Epilepsieerkrankung vielseitig und komplex sind. Defekte an bestimmten Ionenkanälen durch Mutationen oder Umwelteinflüsse, sowie ein Ungleichgewicht in Neurotransmittersystemen, die zu einer mehr oder minder starken Sensibilität von Neuronen und Neuronennetzwerken gegenüber einkommender Signale führen, sind ohne Zweifel die Hauptursachen.

1.2 Ionenkanäle und neuronale Aktivität

Die komplexen, noch unvollständig verstandenen Funktionen von Neuronen werden durch zellinterne (intrinsische) Mechanismen reguliert, die unter anderem von der individuellen Zusammensetzung der Ionenkanäle in der Zellmembran abhängig sind. Dass Neurone über die Weiterleitung von elektrischen Signalen miteinander kommunizieren, wurde schon lange Zeit vor der Entwicklung von Messelektroden vermutet. So stellte der italienische Physikprofessor Alessandro Volta, der Erfinder der Batterie, bereits Mitte des 16. Jahrhunderts eine Ähnlichkeit zwischen der Funktionsweise einer Batterie und des elektrischen Organs von Fischen fest. Außerdem machte er erste Versuche am Froschbein und interpretierte die Muskelkontraktion im

Zuge eines elektrischen Stimulus bereits als physiologische Eigenschaft von neuronaler Erregung (Piccolino, 2000). Mitte des 20. Jahrhunderts konnte mit der Entwicklung von feinen intrazellulären Glaselektroden (Ling & Gerard, 1949) ein Zusammenhang zwischen der schnellen Änderung des Membranpotentials, also eines Aktionspotentials (AP) und einem erhöhten Natrium- bzw. Kaliumstrom gefunden werden. Hier wurde bereits eine Beteiligung von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Membran vermutet. Die verantwortlichen Forscher waren keine geringeren als Hodgkin und Katz, die an der Entwicklung der *Goldman-Hodgkin-Katz* Gleichung zur Errechnung des Membranpotentials beteiligt waren (Hodgkin et al., 1952; Hodgkin & Katz, 1949). Bis in die 70er Jahre hinein konnte mit dem Einsatz von der scharfen Intrazellulär-Elektrode und der *voltage clamp*-Methode, mit der einer Zelle nun ein kontrollierbares Membranpotential aufgezwungen werden konnte, nur Sammelströme der Zelle gemessen werden. Die isolierte Messung von einzelnen Ionenkanälen war nicht möglich.

Den konkreten Beweis für eine Beteiligung von Ionenkanälen am AP lieferten dann erstmals Neher und Sakman im Jahr 1976 mit der Entwicklung der Patch-Clamp-Methode. Mit dieser konnten zum ersten Mal einzelne Ionenkanäle und ihre Beteiligung am zellulären Verhalten gemessen werden (Neher & Sakmann, 1976). Von da an nahm die Erforschung der Ionenkanäle großes Ausmaß an. Durch Klonierungs- und Sequenzanalysen konnte die Struktur von Ionenkanälen bereits gut erahnt werden. Erweitert wurden die Experimente dann im Jahr 1998 als die Struktur eines Ionenkanals zum ersten Mal mittels Kristallographie dargestellt werden konnte (Doyle et al., 1998).

Das Membranpotential. In der Evolution kam es durch die selektive Permeabilität der Membran für spezifische Ionen, zur Ausbildung einer Potenzialdifferenz über die Membran. Der fehlende Ladungsaustausch und die Ansammlung negativ geladener Ionen und Zellbestandteile, resultierten in einem an der Innenseite der Membran gegenüber der Außenseite negativem (Ruhe-) Potenzial. Die Einlagerung von Glykoproteinen, die Poren für spezifische Ionen formten, erlaubte der Zelle mit der Zeit einen kontrollierten Austausch von Ionen mit der Außenwelt. Diese Ionenkanäle sind fortan für die stetige Aufrechterhaltung des Potenzials, die Kommunikation zur Außenwelt und später die Entstehung von elektrischen Signalen verantwortlich (Abb. 2). In den meisten Neuronen liegt das Ruhemembranpotential bei um die -70 mV (Kolaj et al., 2012; Spruston & Johnston, 1992; Zhang, 2004). Durch die unterschiedliche Ionenzusammensetzung intra- und extrazellulär, bildet sich ein elektrochemischer Gradient mit der Tendenz eines Natriumstroms nach innen und eines Kaliumstroms nach außen aus. Das Potential bei dem kein Stromfluss mehr stattfindet, da das elektrische und chemische Diffusionsbestreben ausgeglichen sind, wird das Gleichgewichtspotential genannt (Wright, 2004).

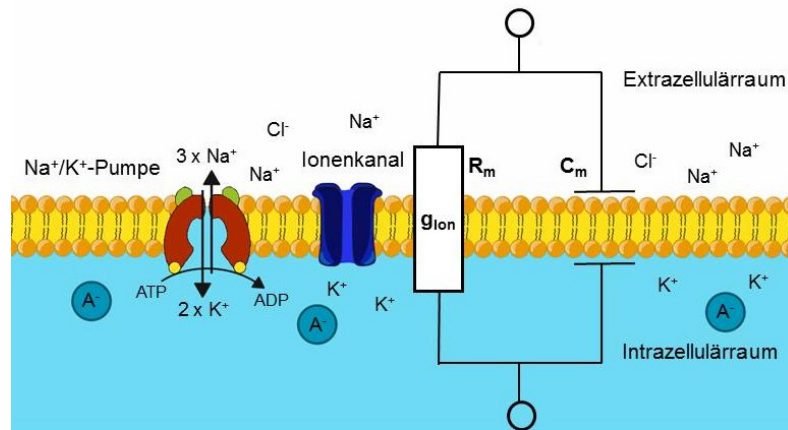


Abb. 2: Die Plasmamembran als Kondensator. Die Abbildung zeigt eine biologische Membran, die als nicht-leitende Doppelschicht aus Phospholipiden die beiden leitenden Flüssigkeiten des Intra- und Extrazellulärums voneinander abgrenzt. Somit bildet sie einen Kondensator. Das Stück Membran kann elektrisch durch ein Ersatzschaltbild beschrieben werden. Durch die ungleiche Verteilung von Ladungen, vorrangig durch Natrium an der Außenseite und Kalium und negativ-geladene Anionen (A-) an der Innenseite der Membran, kommt es zu einem über die Membran von innen nach außen negativen Membranpotential. In Ruhe sind nur Kaliumkanäle durchlässig. Der Kehrwert der Summe der Ionenleitfähigkeiten (hier repräsentiert durch einen Kanal) bildet den ohmschen Widerstand der Zellmembran (R_m). Durch die A- werden die Kaliumionen in der Zelle akkumuliert, während Natriumionen aussen vermehrt auftreten. Dieses Ungleichgewicht wird verstärkt durch die Na^+/K^+ -Pumpe, die Natrium aus und Kalium in die Zelle pumpt. Die Kapazität C_m gibt an wieviel Ladung der Kondensator, also die Membran pro Spannung speichern kann.

Jedes Ion hat sein eigenes Gleichgewichtspotential E_{Ion} , welches mit der Nernst-Gleichung berechnet werden kann:

$$E_{\text{Ion}} = \frac{R * T}{F} \ln \frac{[\text{Ion}]_a}{[\text{Ion}]_i} \quad \text{I}$$

(R = Gaskonstante = $8,314 \text{ J} / (\text{mol K})$, T = absolute Temperatur, F = Faraday-Konstante = 96.487 °C , $[\text{Ion}]_a$ und $[\text{Ion}]_i$ = Ionen-Konzentration außen und innen)

Um diesen Gradienten aufrecht zu erhalten existieren Ionenpumpen, die aktiv und unter Energieverbrauch Ionen in die Zelle oder aus ihr heraus transportieren. Dazu zählt die Na^+/K^+ Pumpe, welche drei Natrium-Ionen nach außen gegen zwei Kalium-Ionen nach innen austauscht (Glitsch, 2001).

Einteilung der Ionenkanäle. Ionenkanäle werden anhand ihrer Ionenspezifität, Struktur, Eigenschaften und physiologischen Funktion identifiziert. Nach grober Einteilung der Ionenkanäle gibt es die spannungsabhängigen Kanäle, wie z.B. die spannungsabhängigen Kalium (K_v)- und Natrium (Na_v)- Kanäle und Liganden- gesteuerte, welche sich in intra- und extrazellulär gesteuerte Ionenkanäle unterteilen lassen. Zu den extrazellulären Liganden-gesteuerten Ionenkanälen gehören vor allem diejenigen die Neurotransmitterbindstellen besitzen, wie z.B. die (ionotropen) Glutamat- und GABA-Rezeptoren. Intrazellulär Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind z.B. Calcium (Ca^{2+})- und

Natrium (Na^+)-aktivierte Kaliumkanäle und Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle). Viele Ionenkanäle werden in Folge einer Signalkaskade, z.B. durch die Aktivierung eines Guanosintriphosphat (G)-Protein (metabotropen) gekoppelten Rezeptors (engl. *G-Protein coupled receptor*, GPCR), reguliert (Katritch et al., 2013). Es gibt drei verschiedene G-Protein Subfamilien: G_s , G_i - und G_q . Die Aktivierung von G_s -Proteinen löst beispielsweise eine cAMP-abhängige Reaktion aus und kann in einer Aktivierung der Adenylatzyklase enden, die daraufhin einen Ionenkanal phosphoryliert (Halls & Cooper, 2017). Phosphorylierung ist ein weiterer Mechanismus einen Kanal zu aktivieren oder sensibler für einen physiologischen Reiz zu machen.

Natriumkanäle. Die spannungsabhängigen Natrium (Na_v)-Kanäle öffnen bei einer Spannung von ca. -40 mV und tragen maßgeblich zu der Ausbildung eines Aktionspotentials bei (Bean, 2007). Nach Aktivierung bleiben die Kanäle ungefähr eine Millisekunde geöffnet, während Natrium in die Zelle strömt und sich das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential für Na^+ annähert. Daraufhin gehen die Na_v -Kanäle in einen inaktiven Zustand über und können nicht wieder geöffnet werden solange sich das Membranpotential nicht in der Nähe des Schwellenwerts befindet.

Calciumkanäle. Die spannungsabhängigen Calciumkanäle (Ca_v -Kanäle) tragen zu den Membraneigenschaften von Dendriten und der Fusion von Neurotransmittervesikeln in der Synapse bei und sind außerdem in einigen Neuronen am AP beteiligt. Sie umfassen vier Arten von spannungsgesteuerten Calciumkanälen: Die L (engl. *longlasting*)-Typ, T (engl. *transient*)-Typ, P (Purkinje-Zellen des Kleinhirns)-Typ und die N (engl. *neither*)-Typ Ca_v -Kanäle (Simms & Zamponi, 2014).

Kaliumkanäle. Für die Repolarisation sind die Kaliumkanäle verantwortlich. Da die Zellen universell im Zytoplasma höhere Kaliumkonzentrationen als extrazellulär aufweisen, führt eine Öffnung von Kaliumkanälen automatisch zu einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotentials, welches in den meisten Zellen bei ca. -90 mV liegt (Yost, 1999). Damit wird die Wahrscheinlichkeit für eine Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen erheblich abgesenkt. Kaliumkanäle stellen die größte Familie der Ionenkanäle und können funktionell und strukturell in vier Gruppen eingeteilt werden: Die spannungsabhängigen (K_v) und Calcium-aktivierten (K_{Ca}) Kaliumkanäle mit sechs Transmembran (TM)-Domänen (Abb. 3 C), die zwei TM-Domänen einwärts-gleichgerichteten (K_{ir}) Kaliumkanäle (Abb. 3 A) und die zwei-Poren Domänen (K_2P) Kaliumkanäle mit vier TM-Domänen (Abb. 3 B) (Miller, 2000).

Mit ihrer Fähigkeit Einfluss auf die elektrochemische Zusammensetzung im Intrazellulärraum zu nehmen und somit das Membranpotential kurzzeitig zu depolarisieren bzw. hyperpolarisieren, trägt die Zusammensetzung von Ionenkanälen in der Zellmembran zum charakteristischen Entladungsmuster der Nervenzelle bei.

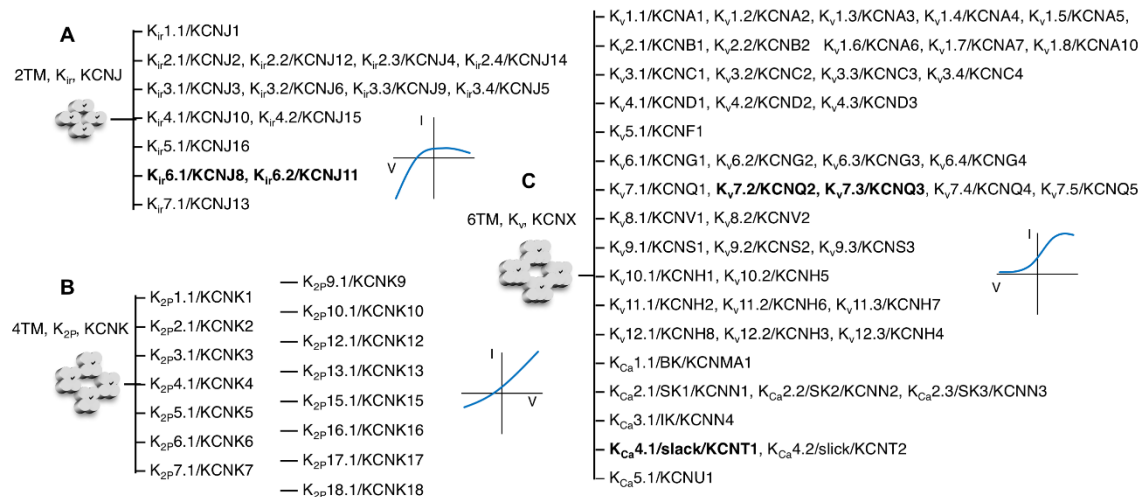


Abb. 3: Schematische Einteilung der alpha-Untereinheiten von Kaliumkanälen anhand der Sequenzähnlichkeiten und Transmembrandomänen. Die für diese Arbeit relevanten Ionenkanäle sind hervorgehoben. (A) Zu den Kaliumkanälen mit zwei Transmembrandomänen (TM) gehören die einwärts-gleichgerichteten Kaliumkanäle (K_{ir}), welche auf dem Gen KCNJ kodiert sind. Die Strom (I)-Spannungs (V)-Kurve zeigt bei positiven Spannungen eine Umkehr der Stromrichtung. (B) Die zwei-Poren-Kaliumkanäle besitzen vier TM und werden durch das Gen KCNK kodiert. (C) Die 6 TM-Kaliumkanäle werden durch das Gen KCNX kodiert und sind spannungsabhängig. Schema wurde verändert nach (Köhling & Wolfart, 2016).

Muster neuronaler Aktivität. *In Vivo* können verschiedene Entladungsmuster voneinander abgrenzt werden. Es gibt tonische, tonisch-phasische und phasische Entladungsmuster (Radulescu, 2010; Zhang et al., 2009a). Letzteres kann intrinsisch durch den *burst*-Phänotyp erzeugt werden (Sabatier et al., 2004). Tonische Entladungstypen sind bei konstanter Reizstärke durch eine regelmäßige Abfolge von APs ohne große Pausen, charakterisiert. Phasisch-tonische Typen reagieren auf einen konstanten Reiz mit einer initialen hohen Frequenz an APs gefolgt von einer immer niedrigeren Frequenz. Hier lassen sich Abstufungen von adaptivem Verhalten erkennen. Je länger oder stärker die eintreffende Depolarisation desto längere Pausen können zwischen den APs auftreten. Diese Adaption des Entladungsmusters wird auch *Spike Frequency Adaptation* (SFA) genannt (Abb. 4 A) (Peron & Gabbiani, 2009). Ein Extremfall der Adaption wäre der *burst*-Phänotyp (Abb. 4 A) bei dem initial eine kurze Abfolge von APs mit einer anschließenden langen Aktivitätspause erfolgt. Eine solche AP-Gruppe (*burst*) kann entweder erst bei stärkeren Stromeingängen als Folge von fortgesetzter SFA oder nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip bereits bei geringen Signalstärken vorhanden sein (Bean, 2007). Letzteres wird in einigen Zelltypen durch den T-Typ-Calciumstrom, insbesondere nach Hyperpolarisationen vermittelt, weil hierbei die T-Typ-Kanäle de-inaktivieren und schon bei geringer Depolarisation einen transienten Calciumeinstrom erzeugen (McCormick & Huguenard, 1992).

Auch andere Ionenkanäle bzw. -ströme können SFA vermitteln, dazu gehören der M-Typ Strom (Brown & Passmore, 2009), welcher durch die KCNQ-Kanäle vermittelt wird, eine langsame Erholung der Inaktivierung von schnellen Natriumkanälen (Fleidervish et

al., 1996) und die Nachhyperpolarisierungsströme (Madison & Nicoll, 1984), die im folgendem Kapitel (1.3) beschrieben werden.

1.3 Die langsame Nachhyperpolarisierung

Die langsame Nachhyperpolarisierung (engl. *slow afterhyperpolarisation*, sAHP) tritt mehrere hundert Millisekunden nach einer Abfolge von Aktionspotentialen auf und hält mehrere Sekunden an (Sah & Faber, 2002; Vogalis et al., 2003b).

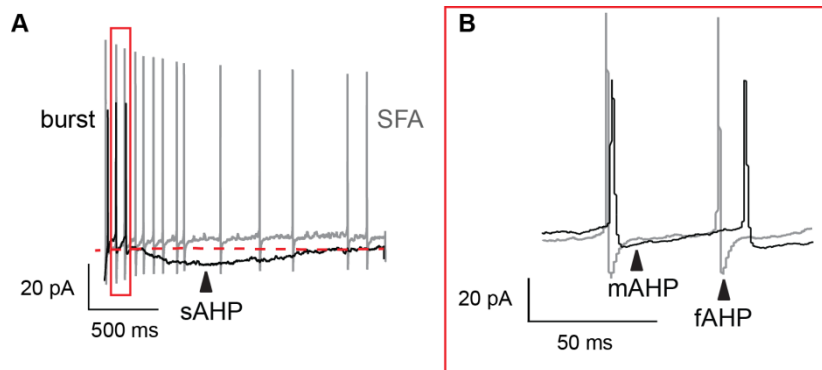


Abb. 4: Der funktionelle Phänotyp von Neuronen und die Nachhyperpolarisationen. (A) Die Abbildung zeigt Patch-Clamp-Messungen im *current clamp*-Modus von einer Körnerzelle mit *burst*-Phänotyp und einer Zelle mit *Spike frequency adaptation* (SFA). Die Spannungsänderungen treten dabei als Antwort auf einen Strompuls auf. Beim *burst*-Phänotyp kann die langsame Nachhyperpolarisierung (sAHP) eindeutig an einem lang-anhaltendem Abfall der Spannung erkannt werden. In dieser Zeit treten keine Aktionspotentialen (APs) auf. Die Zelle mit SFA zeigt eine höhere Frequenz an APs. Die Intervalle zwischen den APs werden mit Dauer des Pulses länger. Dabei tritt kein sAHP auf. Der Rahmen zeigt die in (B) vergrößerte Region an. (B) Bei näherer Betrachtung von zwei APs, kann das *medium* AHP (mAHP) und *fast* AHP (fAHP) erkannt werden. Das fAHP verkürzt die AP-Dauer. Das mAHP hingegen verlängert das Intervall zwischen zwei APs.

Dadurch grenzt sich das sAHP von den schneller erfolgenden medium AHP (mAHP, 5-100 ms) und *fast* AHP (fAHP, 2-5 ms) ab (Abb. 4). Das fAHP folgt direkt einem einzelnen AP bzw. ist für die Repolarisation mitverantwortlich (Storm, 1987). Dem fAHP schließt sich das mAHP an, welches sowohl nach einem einzelnen, als auch nach einer kleinen Gruppe von APs auftreten kann (Storm, 1990). Das sAHP hingegen wird in dem meisten Fällen nach einem *burst* von vielen APs bzw. einer längeren (in dieser Arbeit 100 ms) Depolarisation ausgelöst.

1.3.1 Die Physiologie des sAHPs

Seit den 80er Jahren als die ersten Dokumentationen der Nachhyperpolarisationsströme in Forschungsarbeiten auftauchten, wurde bereits viel Mühe in die Charakterisierung der AHPs von verschiedenen Zelltypen investiert. Schnell stellte sich heraus, dass die AHPs Kaliumströme darstellen, die zum großen Teil Calcium-abhängig sind (Alger & Nicoll, 1980; Andrade & Aghajanian, 1984; Hotson & Prince, 1980; Lancaster & Adams, 1986).

Die für das Calcium-abhängige fAHP und mAHP verantwortlichen Ionenkanäle waren ebenso schnell gefunden. Während das fAHP v.a. von *big conductance* (BK)-Kanälen

generiert wird, unterliegt das mAHP hauptsächlich einem Strom durch *small conductance* (SK)-Kanäle, wobei es hier noch Uneinigkeiten gibt (Andrade et al., 2012; Faber & Sah, 2002; Stocker et al., 1999; Storm, 1987; Vergara et al., 1998; Wolfart et al., 2001). Außerdem tragen BK-, KCNQ- und HCN (*engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*)-Kanäle auch noch zum mAHP bei (Storm, 1989). Die Suche nach den sAHP-Kanälen und Mechanismen gestaltete sich als schwierig und ist bis heute nicht abgeschlossen. Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten Ergebnisse zur Suche nach dem sAHP-Kanal vorgestellt.

Calciumabhängigkeit. Dass das sAHP von Neuronen (direkt oder indirekt) durch den Anstieg von intrazellulärem Calcium während mehrerer direkt aufeinanderfolgenden Aktionspotentiale aktiviert wird, konnte schnell und eindeutig festgelegt werden (Lancaster & Adams, 1986; North, 1973; Storm, 1987). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Kopplung von sAHP-Kanal und Calciumkanal zell-spezifisch ist und so gut wie jeder Strom durch einen Calciumkanal-Typ das Potential hat den sAHP-Kanal zu aktivieren. So wurde gezeigt, dass L-Typ-Calciumkanäle in die Aktivierung des sAHPs von CA1- und CA3-PCs involviert sind, während L- und N-Typ-Kanäle das sAHP in DG-GCs und L-, N- und P-Typ-Kanäle das sAHP in sympathischen Neuronen von Meerschweinchen aktivieren (Aradi & Holmes, 1999; Martinez-Pinna et al., 2000; Moyer et al., 1992; Tanabe et al., 1998). Auch die T-Typ-Kanäle konnten in Neuronen des Thalamus mit dem sAHP in Zusammenhang gebracht werden (Zhang et al., 2009b).

Neuromodulation. Das sAHP grenzt sich von den anderen Komponenten der Nachhyperpolarisierung vor allem durch seine mannigfaltige Beeinflussbarkeit via Neuromodulation ab (Andrade et al., 2012). Das sAHP wird stark durch Transmitter reguliert, die den $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptor aktivieren und so zu einer cAMP-Erhöhung und der Aktivierung der Proteinkinase A führen (Andrade & Nicoll, 1987; Foehring et al., 1989; Lancaster et al., 2006; McCormick & Prince, 1988; Pedarzani & Storm, 1993, 1995). Die Spaltung eines $G\alpha_{q/11}$ -Proteins, welches wiederum eine Aktivierung der Phospholipase C und die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerine (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) zur Folge hat, kann ebenso Einfluss auf das sAHP nehmen (Dutar & Nicoll, 1988; Haas & Konnerth, 1983; Villalobos et al., 2011). Für die meisten bekannten Neurotransmitter und Neuromodulatoren, welche über GPCRs wirken, wurde dabei eine inhibierende Wirkung auf das sAHP beschrieben (Andrade et al., 2012).

Calcium-abhängige Kaliumkanäle. Bis auf die Calciumabhängigkeit und die starke Neuromodulation, scheinen die sAHP-Mechanismen und beteiligten Ionenkanäle in verschiedenen Zelltypen heterogen exprimiert zu sein. Das zeigen die verschiedensten Studien der letzten Jahre. Zunächst wurde sich auf die bekannten Calcium-abhängigen Kaliumkanäle, wie *big conductance* (BK)- und *small conductance* (SK)-Kaliumkanäle konzentriert, welche jedoch von den meisten Studien für die Beteiligung am sAHP ausgeschlossen werden konnten (Bond et al., 1999; Villalobos et al., 2004). Vor allem die Beteiligung von Apamin-resistenten, aber auch Apamin-sensitiven SK-Kanälen wird in manchen Zelltypen noch diskutiert (Empson & Jefferys, 2001; Kato et al., 2006). Auch

intermediate conductance (IK)-Kanäle standen in der Diskussion in CA1-Neuronen das sAHP zu generieren (Turner et al., 2016). Eine andere Arbeitsgruppe konnte den IK-Kanälen jedoch nachweislich keine Beteiligung am sAHP nachsagen (Wang et al., 2016).

KCNQ. KCNQ-Kanäle sind spannungsabhängige Kaliumkanäle der Familie K_v7 . Die KCNQ-Gene kodieren fünf der K_v7 -Kanaldomänen ($K_v7.1-7.5$) (Tzingounis & Nicoll, 2008). KCNQ-Kanäle wurden durch den M-Strom (durch Muscarin inhibierbar) bekannt, der im Jahr 1980 in sympathischen Nerven von Fröschen und Ratten gefunden wurde (Brown & Adams, 1980). In Neuronen wird der native M-Strom entweder durch ein Heteromer aus $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Domänen oder ein Homomer aus $K_v7.2$ Domänen getragen, wobei hier eine Beteiligung von $K_v7.5$ Domänen vermutet wird (Shah et al., 2002; Wang et al., 1998; Wickenden et al., 2001). M-Ströme werden bei einem geringen Potential (engl. *low threshold*) von -60 mV aktiviert und deaktivieren sehr langsam (Brown & Passmore, 2009). Somit tragen sie nicht maßgeblich zu der Repolarisation von einzelnen APs bei, sondern dämpfen neuronale Aktivität ein, die in kurzen zeitlichen Abständen wiederholt auftritt. Die heteromultimeren Kanäle KCNQ2/3 werden durch die spezifischen Blocker XE991 und Linopiridine blockiert und durch das Antiepileptikum Retigabine aktiviert (Miceli et al., 2008).

Eine Studie von Gu et al. im Jahr 2005 zeigte, dass das mAHP in CA1-PCs bei einem Ausgangs-Membranpotential von -60 mV durch den KCNQ-Blocker XE991 blockiert wird (Gu et al., 2005). In derselben Studie konnte mit *current clamp*- und *whole cell*-Experimenten jedoch keine Wirkung des Blockers auf das sAHP festgestellt werden. Umso überraschender war das Ergebnis von Tzingounis und seiner Arbeitsgruppe, die eine Beteiligung von KCNQ am sAHP von GC des DG postulierten und dieses mit einer genetischen Deletion von KCNQ2 und KCNQ3 und *whole cell*-Messungen bekräftigten (Tzingounis & Nicoll, 2008).

ATP-abhängige Kaliumkanäle. K_{ATP} -Kanäle gehören zu den *inward rectifier* (deutsch ‚einwärts gleichgerichtete‘) Kaliumkanälen (K_{ir}) und zeigen im DG eine starke Expression (Zawar et al., 1999). K_{ir} -Kanäle führen bei starker Hyperpolarisation zu einem einwärtsgerichteten Kaliumstrom (Abb. 3). Jedoch kommt eine derartige Situation in der Realität nicht vor. K_{ATP} -Kanäle sind Heterooktamere, bei denen die Pore aus vier K_{ir} -Domänen ($K_{ir6.1}$ und $K_{ir6.2}$) gebildet wird. Jede dieser Domänen hat einen intrazellulären Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1-4) gebunden (Akrouh et al., 2009). Die $K_{ir6.2}$ -Domäne besitzt eine Bindestelle für den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP). Wenn die intrazelluläre Konzentration von ATP in der Zelle steigt, wird die Offenwahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle abgesenkt. Andersherum wird die Offenwahrscheinlichkeit erhöht, wenn die Adenosindiphosphat (ADP)-Konzentration durch eine Hydrolyse von ATP in der Zelle ansteigt. Damit setzen die Kanäle einen Mangel an Energie in der Zelle in eine entsprechend hilfreiche Beruhigung der elektrischen Aktivität um. K_{ATP} -Kanäle werden über die Nukleotidabhängigkeit hinaus, durch eine Vielzahl an Faktoren reguliert, wie z.B. über eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A und über PIP_2 , welches ebenso an die $K_{ir6.2}$ -Untereinheit bindet. MgADP, Sulfonylharnstoffe wie z.B. die Antidiabetika Tolbutamide und Glibenclamid,

aber auch K_{ATP} -Aktivatoren wie z.B. das blutdrucksenkende Medikament Diazoxid wirken durch eine Interaktion mit SUR1 (Koster et al., 1999).

In einer Studie von Godfraind and Krnjevic im Jahr 1993 wurden erstmals die K_{ATP} -Kanäle in CA1-Neuronen mit einem langen hyperpolarisierenden Kaliumstrom in Zusammenhang gebracht, der hier in Verbindung mit einem mehrminütigem Sauerstoffmangel auftauchte (Godfraind & Krnjevic, 1993). Dieser Strom konnte fast vollständig mit dem K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamide inhibiert werden. Ein Jahr später wurde genau diese Eigenschaft auch für das sAHP nach einem *burst* von APs in CA1-Neuronen festgestellt (Erdemli & Krnjevic, 1994). Tanner et al. zeigten dann im Jahr 2011, dass sich ein post-*burst* sAHP in GCs des DG während der Applikation des K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid um 30 % reduzierte (Tanner et al., 2011).

Natrium-Abhängigkeit. In einigen Zelltypen wurden auch Natrium-sensitive Komponenten entdeckt. So zeigten Schwindt et al. im Jahr 1989, dass nur die ersten ein bis drei Sekunden des sAHPs von PCs im sensomotorischen Cortex Calcium-abhängig sind. Der letzte Teil ließ sich durch TTX blockieren, was für eine Natrium-Abhängigkeit sprechen würde (Schwindt et al., 1989). Eine weitere Studie aus dem Jahr 2010 beschreibt, dass sich das sAHP von paraventriculären Thalamus-Neuronen aus aktivitätsabhängigen Komponenten zusammensetzt. Eine der Komponenten ist Calcium-, die andere Natrium-abhängig. Letztere tauchte aber erst dann auf, wenn das sAHP mit einer höheren Anzahl von APs ausgelöst wurde und wies andere Sensitivitäten für die Aktivierung durch cAMP und die Proteinkinase C auf (Zhang et al., 2010). Außerdem wurde in einigen Fällen eine Beteiligung der Na^+/K^+ -ATPase am sAHP festgestellt, welche durch die Akkumulation von Natrium während starker neuronaler Aktivität aktiviert wird (Cherubini & Lanfume, 1987; Parker et al., 1996).

Natrium-abhängige Kaliumkanäle. Eine Studie mit Neunaugen zeigt ebenso eine Aktivitäts- und Natrium-abhängige Komponente des sAHPs, die jedoch auch ohne starke Aktivität bereits einen 20%-igen Anteil am sAHP hat (Wallen et al., 2007). Durch pharmakologische und immunohistochemische Experimente, stellte sich heraus, dass der „Slack“-Kanal für die Natrium-abhängige Komponente verantwortlich ist. Natrium-abhängige Kaliumkanäle wurden das erste Mal im Jahr 1984 im Herzen von Meerschweinchen gefunden (Kameyama et al., 1984) und werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit der K_{Ca} -Familie zugeteilt. Es konnte im Zytoplasma verschiedener Zellen eine breite Konzentrationsspanne von 7-80 mM Natrium für den Eintritt des halbmaximalen Effekts (EC_{50}) beobachtet werden. Das erklärt auch die Beobachtungen der variierenden Öffnung von K_{Na} -Kanälen nach einem einzelnen AP oder erst nach einer repetitiven Abfolge von mehreren APs (Bhattacharjee & Kaczmarek, 2005; Dryer, 1994). K_{Na} -Kanäle zeichnen sich durch ihre besonders hohe Leitfähigkeit von 100-200 pS aus und werden durch die Gene Slick und Slack (engl. *sequence like a calcium activated K^+ channel*) kodiert. Während Slick-Kanäle eine ATP-sensitive Aktivierung zeigt, konnte bei Slack-Kanälen eine leichte Chlorid-Sensitivität festgestellt werden (Bhattacharjee et al., 2003; Bhattacharjee & Kaczmarek, 2005; Yuan et al., 2003). Slick- und Slack-Kanäle werden im ganzen Gehirn exprimiert und werden von

Neuromodulatoren via $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren aktiviert (Slack) und inhibiert (Slick) (Santi et al., 2006).

1.3.2 Die Funktion des sAHPs und die Pathophysiologie

Wie erwähnt, spielen die langsame Nachhyperpolarisierung und die unterliegenden Ionenströme eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer AP-Entladungscharakteristik und damit in der intrinsischen neuronalen Erregbarkeit eines Neurons.

Alter und Lernen. Durch das langanhaltende negative Membranpotential und die erhöhte Membranleitfähigkeit während des sAHPs wird die Entstehung von weiteren Aktionspotentialen verhindert. Somit wird der Informationsfluss auf kurze „Pakete“ scharf begrenzt. In einigen Studien konnte eine Korrelation zwischen der sAHP-Ausprägung und dem Alter gefunden werden (Landfield & Pitler, 1984; Power et al., 2002). Die Vermutung, dass das sAHP auch mit altersbedingten Defiziten im Zusammenhang steht, konnte ansatzweise schon von Studien belegt werden. So wurde gezeigt, dass ältere Tiere mit größeren sAHP-Amplituden in CA1-Neuronen, Aufgaben signifikant langsamer erlernten als junge Tiere mit kleineren sAHP-Amplituden (Moyer et al., 2000; Tombaugh et al., 2005). Außerdem konnte auch ein reduziertes sAHP, sowie eine verminderte SFA in beiden Altersgruppen nach dem erfolgreichen Erlernen einer Aufgabe, gemessen werden (Moyer et al., 2000). Eine mögliche Erklärung wäre, dass das sAHP die für den Lernvorgang wichtige synaptische Potenzierung (LTP) verhindert (Sah & Bekkers, 1996).

Emotionen. Eine weitere Funktion lässt sich aus der starken Neuromodulation ableiten, die es Neurotransmittern erlaubt, Einfluss auf den funktionellen Phänotypen des Neurons zu nehmen. So hemmt beispielsweise das Glückshormon Serotonin über die Bindung zum 5-HT₇-Rezeptor das sAHP (Goaillard & Vincent, 2002). Außerdem antworten basolaterale Neurone der Amygdala auf sensorische Stimuli mit emotionaler Komponente mit AP-*bursts* (Nishijo et al., 1988; O'Keefe & Bouma, 1969), welche mit einem sAHP einhergehen (Womble & Moises, 1993). Des Weiteren scheint das sAHP in CA1-Neuronen anfällig auf das Stresshormon Kortikosteron zu reagieren, während das sAHP in Neuronen der Amygdala unverändert bleibt. Liebmann stellte dazu die Hypothese auf, dass Informationen mit emotionaler Komponente effektiver in das Gedächtnis eingespeist werden können (Liebmann et al., 2008). Gemütszustände wirken sich somit gleich auf die Ausprägung des sAHPs und damit auf die Erregbarkeit von Neuronen aus.

Epilepsie. Bei der Suche nach antikonvulsiven Mechanismen als Ansatzpunkt für AEDs könnte sich an bereits existierenden, intrinsischen Mechanismen orientiert werden, welche die Fähigkeit haben exzessive, neuronale Aktivitäten ausbremsen zu können (auch thematisiert in: (Wolfart & Laker, 2015)). Das sAHP wäre hier ein guter Kandidat und wurde auch schon in diesem Zusammenhang erwähnt (Behr et al., 2000; Chamberlin & Dingledine, 1989; Fernandez de Sevilla et al., 2006; Martin et al., 2001; McCormick & Contreras, 2001). Einigen antikonvulsiven Medikamenten wurde zudem ein

modulierender Einfluss auf einen langsamen Hyperpolarisierungsstrom nachgewiesen (via Aktivierung von Calcium L-type Kanälen), der eventuell im Zusammenhang mit der klinischen Wirkung steht (Russo & Constanti, 2004).

Zusammengefasst ist die langsame Nachhyperpolarisierung ein starker Regulator von neuronaler Erregbarkeit und stellt für die Zellen eine überlebenswichtige Funktion dar. Während im jungen Gehirn, das lernfähiger aber auch anfälliger für epileptische Anfälle ist, ein gut ausgeprägtes sAHP von Vorteil sein könnte, mag es im alten Gehirn von Nachteil sein, da ein großer sAHP-Strom den Lernvorgang behindert. Die bedeutungsvolle Funktion des Ionenstroms im Gehirn, dessen Sensibilität gegenüber vielen neuronalen Mechanismen und die inkonsistenten Ergebnisse bei der Suche nach dem sAHP-Kanal bzw. -Kanälen zeigen die Relevanz der Untersuchung der molekularen Mechanismen hinter dem sAHP-Phänomen. In der Epilepsieforschung kann der sAHP-Strom auch als potentieller antikonvulsiver Ansatzpunkt analysiert werden.

1.4 Zielsetzung

Um neuartige antikonvulsive Medikamente bzw. Therapien zu entwickeln, ist es von großer Bedeutung bereits bestehende intrinsische Mechanismen zu verstehen, die möglicherweise exzessive, neuronale Aktivitäten eindämmen können. Wie beschrieben kann dem sAHP genau diese Eigenschaft zugeschrieben werden. In der TLE-Erkrankung besitzen die GCs im Hippocampus ein großes antiepileptisches Potential. Das liegt vor allem an der Funktion der GCs, eingehende Informationen aus dem EC zu filtern und der Fähigkeit ihre intrinsische Erregbarkeit als Antwort auf chronische Übererregung runter zu regulieren. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der elektrophysiologischen und pharmakologischen Untersuchung der dem sAHP-Stroms unterliegenden Mechanismen in Körnerzellen des *Gyrus dentatus*.

Für zukünftige Verifizierungen der herausgearbeiteten Ergebnisse wurde außerdem eine *Knock Down*-Technik etabliert, die es erlaubt den Aufbau von bestimmten Ionenkanälen mittels RNA-Interferenz gezielt zu verhindern und die Auswirkungen auf das sAHP in organotypischen Schnittkulturen zu beobachten.

Zusammengefasst sollen in dieser Arbeit folgende Punkte behandelt werden:

Elektrophysiologische Untersuchung des sAHP-Stroms (3.1)

- Wie sieht der funktionelle Phänotyp von DG-Körnerzellen aus, wenn ihr intrazelluläres Milieu ungestört ist (*perforated* Patch-Clamp-Technik)? (Kapitel 3.1.1)
- Steht der sAHP-Strom im Zusammenhang mit dem funktionellen Phänotyp? (Kapitel 3.1.2, 3.1.3)
- Ist der sAHP-Strom im Kainat-Modell für TLE verändert? (Kapitel 3.1.1, 3.1.3)

Pharmakologie des sAHP-Stroms (3.2)

- Welche Ionenkanäle und Mechanismen unterliegen dem sAHP in Körnerzellen? (Kapitel 3.2.1 bis 3.2.12)

Etablierung der *Knock Down*-Technik (3.3)

- Können organotypische Schnittkulturen für die RNAi zum Einsatz kommen bzw. besitzen die Körnerzellen der OHSCs eine *in vivo*-ähnliche Physiologie? (Kapitel 3.3). Wie kann der Transfer von inhibitorischer RNA in die Zellen bewerkstelligt werden? (Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3)

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen und die jeweiligen Herstellerangaben sind unter den zugehörigen Methoden aufgelistet. Einwegartikel und Laborstandard-Gerätschaften sind bis auf Ausnahmen nicht gesondert angegeben.

2.1 Elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchung des sAHP-Stroms von DG-Körnerzellen

Folgende Materialien und Methoden wurden für die elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchung des sAHP-Stroms von DG-GCs benötigt.

2.1.1 Präparation von akuten hippocampalen Hirnschnitten

Für die Präparation von akuten Hirnschnitten wurden C57BL/6N-Mäuse in einem Alter von $9 \pm 0,1$ Wochen (von 7 bis 14 Wochen) mit Isofluran betäubt und dekapitiert. Das Gehirn wurde aus dem Schädel entnommen und direkt in eine eiskalte und Carbogen (Kohlendioxid 5 % und Sauerstoff 95 %, Linde Gas)-begaste Sucroselösung gelegt (Tabelle 1). Ein Teil des Vorderhirns und das Cerebellum wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt. Das Gehirn wurde mit der kaudalen Seite nach unten auf der Plattform eines Vibratoms (VT1200S, Leica, Bensheim) mit Cyanoacetat-Kleber (Loctite, Henkel, Düsseldorf) befestigt. Die Plattform wurde in die ebenso eiskalte und begaste Sucroselösung der Vibratomkammer überführt und das Gehirn in 350 μm dicke Hirnschnitte geschnitten. Die Hirnschnitte wurden auf der linken, ventralen Seite markiert und daraufhin für 30 Minuten in begaster Sucroselösung bei 36 °C inkubiert. Mit der Markierung auf der rechten Seite wurde der Hirnschnitt ca. 30 Minuten vor der Messung in die mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Tabelle 1) gefüllte Badkammer gelegt und der suprapyramidale DG über das Kamerabild des Mikroskops gesucht.

2.1.2 Die Patch-Clamp-Methode

Die Patch-Clamp-Methode wurde zur Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften von hippocampalen GCs mit Fokus auf der langsamen Nachhyperpolarisation, angewendet. Das Patch-Clamp-Verfahren wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakman entwickelt und stellt seither einen wichtigen Beitrag zur neurobiologischen Erforschung von Nervenzellen und neuronalen Netzwerken dar (Neher & Sakmann, 1976). Die Methode zeichnet sich durch die Messung von kleinsten Strömen im Pikoampere (pA)-Bereich, ohne die „Verunreinigung“ von unspezifischen Leckströmen, aus. Dabei werden Leckströme durch das Erreichen eines hochohmigen Widerstandes zwischen Ableitungselektrode und Membran verhindert.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Patch-Clamp-Messungen mit zwei verschiedenen Messmethoden zum Einsatz: die Strom (*current clamp*, cc)- und die Spannungsklemme

(*voltage clamp*, *vc*). Bei der Verwendung der Stromklemme wurde eine Potentialänderung als Antwort auf einen injizierten Strompuls beobachtet, während bei der Verwendung der Spannungsklemme eine Stromantwort als Folge auf eine Potentialänderung gemessen wurde. Bei letzterer Methode wurde der Strom aufgezeichnet, der benötigt wurde um das Membranpotential auf ein vorgegebenes Haltepotential zu klemmen.

Set-Up. Das Patch-Clamp-Set-Up bestand aus einem schwingungsgedämpften Tisch, der zur Isolierung von elektromagnetischen Einstrahlungen (z.B. der 50 Hz-Netzfrequenz) von einem Faraday Käfig umgeben war. Auf dem Tisch war ein inverses Mikroskop befestigt (Axioskop2 FS, Zeiss, Oberkochen Deutschland), welches für die visuelle Kontrolle des Patch-Clamp-Vorganges mit einer Kamera (Axiocamp ICc1, Zeiss) verbunden war. Für die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen kam eine Kaltlichtlampe (HBO100, Zeiss) zum Einsatz, welche zusammen mit verschiedenen Filtersätzen die Badkammer mit Licht einer gewünschten Wellenlänge ausleuchten konnte. Zur Visualisierung von emGFP (engl. *Emerald Green Fluorescent Protein*) diente das Filter-Set 38 HE (Zeiss, Göttingen). Die Objektive des Mikroskops wurden in die ACSF-Lösung der Badkammer mit dem zu messenden Akutschnitt getaucht. Die Badkammer war über ein Schlauchsystem mit einer Ventil-kontrollierten Applikationsanlage (Auto Mate Scientific, Berkely, CA, USA) verbunden. Über diese konnten die mit Carbogen begasten ACSF- und CTRL-Lösungen (Tabelle 1), sowie die verschiedenen pharmakologischen Testlösungen (Kapitel 2.1.4) eingespült werden. Die Durchflussgeschwindigkeit (ca. 0.3 Tropfen/Sekunde) wurde über eine Schlauchklemme reguliert. Neben der Badkammer wurde ein Patch-Clamp-Vorverstärker, die so genannte *Headstage*, an einer über einen Mikromanipulator beweglichen Vorrichtung angebracht. An diesem wurde der Pipettenhalter für die Elektrode befestigt. Der Pipettenhalter wurde mit einem Überdrucksystem verbunden, welches für die Ausbildung einer hochohmigen Abdichtung wichtig war. Um die elektrophysiologischen Daten störungsfrei messen zu können, wurde ein modifizierter SEC05LX-Verstärker (NPI, Tamm, Deutschland) verwendet und die Daten bei 20 kHz für *voltage clamp*- und 2 kHz für *current clamp*-Messungen gefiltert. Die Erden der elektrisch-leitenden Gegenstände am Patch-Clamp-Set-Up liefen an einem Massenpunkt gebündelt zusammen. Die Daten wurden mit einem ITC18 D/A Wandler (Instrutech, Port Washington, NY, USA) digitalisiert (20 kHz für *vc* und 40-50 kHz für *cc* Messungen) und über die Software PatchMaster (Heka, Lambrecht, Deutschland) dargestellt.

Patch-Clamp-Lösungen. Die verwendeten Lösungen für die Patch-Clamp-Technik sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Sucroslösung wurde für die Präparation verwendet, wohingegen die ACSF-Lösung für die Messungen zum Einsatz kam. Die ACSF-Lösung wurde für die Herstellung der CTRL-Lösung noch zusätzlich mit verschiedenen Substanzen versetzt (Tabelle 2). Die als KMeSO₄ (Kaliummethylsulfonat) und KGluc (Kaliumglukonat) aufgeführten Lösungen wurden als Pipettenlösungen (Intrazellulärlösungen) verwendet. Natriumchlorid (NaCl) wurde von VWR Chemicals (Darmstadt), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) von Merck Chemicals GmbH

(Darmstadt), Biocytin von Invitrogen (Karlsruhe) und alle anderen Substanzen wurden von dem Hersteller Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Tabelle 1: Patch-Clamp-Lösungen. Alle Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst. Carbogen ist ein Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂.

Lösungen	Substanzen (mM)	pH Wert	Osmolarität (mosm/kg H ₂ O)
Sucrose	87 NaCl, 36 NaHCO ₃ , 2.5 KCl, 1.25 NaH ₂ PO ₄ , 0.5 CaCl ₂ , 7 MgCl ₂ , 75 Sucrose, 10 Glukose	begast mit Carbogen	339
ACSF	125 NaCl, 25 NaHCO ₃ , 2.5 KCl, 1.25 NaH ₂ PO ₄ , 2 CaCl ₂ , 1 MgCl ₂ , 25 Glukose	begast mit Carbogen	341.5
KMeSO ₄	135 Kaliummethylsulfonat, 20 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 2 MgCl ₂ , 2 Na ₂ ATP, 0.2 % Biocytin	7.28	332
KGluc	135 Kaliumglukonat, 20 KCl, 10 HEPES, 0.1 EGTA, 2 MgCl ₂ , 2 Na ₂ ATP, 0.2 % Biocytin	7.28	332

Vorbereitung der Messungen. Der zu messende akute Hirnschnitt wurde zur Fixierung unter einem mit Nylonfäden bezogenen Platinrahmen in die Badkammer gelegt. Eine Referenzelektrode aus chloriertem Silberdraht (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) wurde am Badrand aufgestellt und in die ACSF-Lösung eingeführt. Die Patchpipette bestand aus einer stumpfen Kapillare aus Borosilikatglas (Typ: Standard Wall ohne Filament; OD: 1.0 mm, ID: 0.5 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld), welche mittels eines Pipetten-Pullers (DMZ-Universal-Electrode-Puller, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH Martinsried) an einem Ende zu einer spitz zu laufenden, aber stumpfen Öffnung gezogen wurde. Der Öffnungsdurchmesser lag im Bereich von 1 µm. Durch die hintere Öffnung der Glaskapillare wurde nun eine Pipettenlösung (KMeSO₄ oder KGluc, Tabelle 1) gefüllt, die osmotisch in etwa der physiologischen Intrazellulärlösung (theoretische Osmolarität: 332 mosm/kg H₂O) entsprach. In diese wurde die Elektrode, ein chlorierter Silberdraht eingeführt. Mit einem Mikromanipulator wurde die Ableitungselektrode in die mit ACSF gefüllte Badkammer gefahren und das Potential der Elektrode gegen das ACSF auf 0 mV gesetzt. Der Widerstand der Pipettenöffnung wurde im cc-Modus mittels einer Brückenschaltung kompensiert (Tabelle 11).

Messung einer Zelle. Um die hochohmige Abdichtung (engl. *seal*, R_{Seal}) und damit ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen, wurde ein leichter Überdruck an die Pipettenspitze angelegt und diese unter optischer Kontrolle mittels Videomikroskopie an die Zelle gefahren, so dass der Überdruck die Membran eindrückte. Der Überdruck wurde nun eingestellt und durch einen kontrollierten Unterdruck wurde am hinteren Ende der Glaspipette die Membran in die kleine Öffnung der Patchpipette gezogen. Damit wurde

der so genannte *cell attached*²-Modus erreicht. Dem Membranfleck in der Patchpipette wurde nun ein Potential von -60 mV aufgezwungen, so dass mit dem Ohm'schen Gesetz (Formel II) und der bekannten, benötigten Stromstärke der *seal*-Widerstand bestimmt werden konnte. Um eine stabile Konfiguration ohne Leckströme zu erreichen, sollte der R_{Seal} nun im Giga-Ohm-Bereich liegen (in unseren Experimenten bei $10.9 \pm 7.1 \text{ G}\Omega$, $n = 191$). Jetzt konnte ein elektrischer Zugang zur Zelle durch einen zusätzlichen schnellen und kurzen Unterdruck erzielt werden. Die Membran riss dadurch in der Öffnung der Glaspipette auf, wobei die Abdichtung erhalten bleiben sollte.

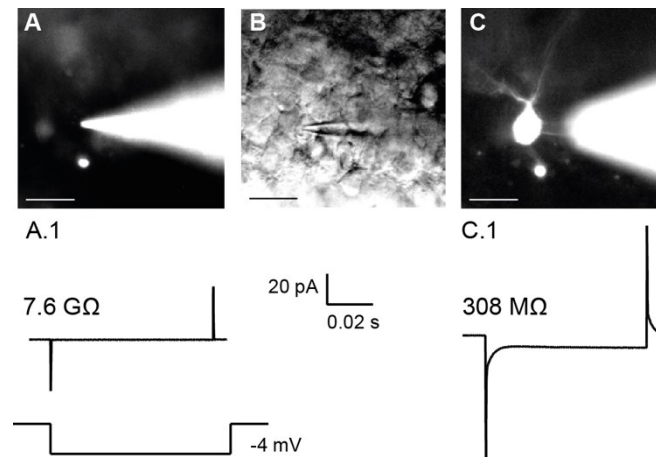


Abb. 5: Der elektrische Widerstand einer angepatchten Körnerzelle im *cell attached*- und im *whole cell*-Modus. Die Patchpipette war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 geladen. (A) Im *cell attached*-Modus bestand kein Zugang zur Zelle. Mit dem entsprechenden Fluoreszenzfilter konnte der Farbstoff in der Pipette visualisiert werden. (A.1) Die Stromantwort auf eine Spannungsänderung zeigte die kapazitiven Lade- und Entladeströme zu Beginn und zum Ende des Spannungspulses. Der Zugangswiderstand wurde im vc-Modus aufgezeichnet und berechnet sich mit dem Ohm'schen Gesetz aus dem applizierten Spannungspuls von -4 mV und der darauffolgenden Basislinie der Stromantwort. Er lag bei 7.6 GΩ und zeigte an, dass weder ein Zugang zum Zellinneren bestand, noch große Leckströme auftraten. (B) Im normalen Durchlicht war die gemessene Körnerzelle mit Patchpipette sichtbar. (C) Im *whole cell*-Modus gab es einen Zugang zur Zelle, erkennbar an dem Farbstoff in der Zelle und dem (C.1) Eingangswiderstand, der nun bei 308 MΩ lag. Maßstab: 5 μm.

Der Zustand wird als Ganzzellableitung (*whole cell*) bezeichnet. Im cc-Modus ließ sich nun der Serienwiderstand R_{ser} zwischen Glaspipette und dem Intrazellulärraum kompensieren, der auf Grund von verbleibenden Membranfragmenten in der Pipettenöffnung, etwas höher liegt als der Pipettenwiderstand. Zwar ließ sich der Serienwiderstand aufgrund seiner schnellen Kinetik leicht vom Membranwiderstand unterscheiden, jedoch war es unmöglich ihn von anderen Komponenten wie dem Axialwiderstand eindeutig zu trennen, so dass er immer nur ungefähr abgeschätzt werden konnte. Im Fall von der *perforated* Patch-Clamp-Methode (Kapitel 1.1.2) verblieb die Membran in der Pipettenöffnung (im *cell attached*-Modus) und der elektrische Zugang wurde durch den Einbau von Poren geschaffen. Hierbei kam der erhöhte R_{ser} durch die

² Ausgewählte Standardbegriffe aus der Elektrophysiologie werden in dieser Arbeit in englischer Sprache belassen, da sie nicht optimal übersetzt werden können. Sie werden mit *kursiver* Schrift markiert.

verbleibende Membran zustande, der im *bridge*-Modus abgeschätzt und kompensiert wurde (Tabelle 11).

2.1.3 Die *perforated Patch-Clamp*-Methode

Um den sAHP-Strom pharmakologischen Tests zu unterziehen, musste gewährleistet werden, dass der Kaliumstrom über einen längeren Zeitraum hinweg mit einer stabilen Amplitude gemessen werden kann. Dafür musste der Austausch der intrazellulären Flüssigkeit mit der Pipettenlösung durch das porenbildende Antibiotikum Gramicidin verhindert werden, da sonst die für den sAHP-Strom notwendigen intrazellulären Komponenten, wie das Calcium, ausgewaschen werden und der Strom innerhalb von Minuten verschwinden würde (Kapitel 3.1.2). Gramicidin wird aus dem grampositiven Bodenbakterium *Bacillus brevis* gewonnen und kommt dem Erhalt der intrazellulären anionischen Zusammensetzung zu Gute (Kyrozis & Reichling, 1995), indem es Kanäle ausbildet, die ausschließlich für monovalente Kationen (wie zum Beispiel Kalium und Natrium) und kleine Moleküle permeable sind. Anionen, divalente Kationen und größere Moleküle, wie z.B. Glukose können die Kanäle nicht passieren (Andersen et al., 2005). 40 mg/ml Gramicidin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und davon 1,5-2 μ l der Pipettenlösung beigelegt um etwa eine Konzentration von 80 μ g/ml zu erreichen. Die Lösung wurde dann für drei Minuten mit Ultraschall behandelt und in eine Patchpipette gefüllt. Nach dem Erzielen eines Giga-Ohm-*Seals* (deut. Giga-Ohm-Abdichtung) wurde die Pipette im *cell attached*-Modus gehalten (Abb. 6 A).

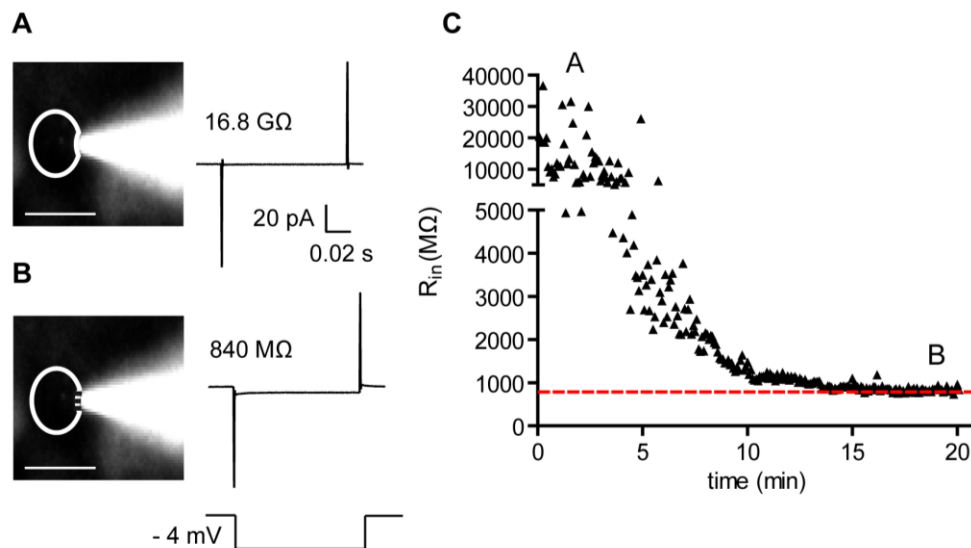


Abb. 6: Die Veränderung des Eingangswiderstandes während der Perforierung einer Zellmembran via Gramicidin. (A) Die Zellmembran-Pipettenformation im *cell attached*-Modus. Das Bild zeigt eine Patchpipette an einer Körnerzelle (Konturen des Somas nachgezeichnet), die mit Alexa488 gefüllt ist. Die fluoreszierende Lösung verblieb in der Patchpipette. Der Testpuls von -4 mV löste einen Ionenstrom aus. Daraus konnte der Eingangswiderstand (R_{in}) berechnet werden. Im *cell attached* Modus liegt der R_{in} im Giga-Ohm-Bereich. (B) Die Zellmembran im perforierten Zustand ließ einen elektrischen Zugang zur Zelle zu, jedoch fand kein Austausch zwischen der Intrazellulär-Flüssigkeit und der Patchpipettenlösung mit Alexa488 statt. Der Eingangswiderstand lag bei 840 MΩ. (C) Die Graphik zeigt die Änderung des R_{in} in einer *perforated Patch-Clamp*-Messung, ausgehend vom *cell attached*-Modus mit einem sehr hohen R_{in} bis zur Stabilisierung des R_{in} auf eine Basislinie (rote, gestrichelte Linie) im Mega-Ohm-Bereich. Maßstab: 5 μ m.

Die Gramicidinporen inkorporierten in einer Zeit von 20-40 Minuten die Membran. Der elektrische Zugang zum Zellinneren nahm während dieser Zeit zu, während der Gesamteingangswiderstand R_{in} abnahm und sich im Idealfall auf eine Basislinie stabilisierte (Abb. 6 B). Mit einer Spannungsänderung von -4 mV konnte der R_{in} während der Inkubationszeit beobachtet werden. Da das Gramicidin lichtempfindlich ist und sich die Poren wieder aus der Membran entfernen können oder aber die perforierte Membran in manchen Fällen aufbrechen kann, so dass die Messung vom *perforated*-Modus in den *whole cell*-Modus übergeht, sollte der R_{in} auch im Laufe der Messung beobachtet werden. Dafür wurde ein Testpuls von -4 mV in das sAHP-Strom-Protokoll integriert. Für die ersten Experimente kam eine Pipettenlösung mit Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz um einen Durchbruch auch visuell erkennen zu können. Dabei blieb der Farbstoff im *perforated*-Modus in der Patchpipette (Abb. 6), während er im *whole cell*-Modus die Zelle füllte (Abb. 5).

2.1.4 Pharmakologie

Die Standardparameter wurden aufgezeichnet, während das Gewebe von einer ACSF-Lösung umspült wurde. Die Messung der sAHP-Stromamplitude erfolgte dann in einer Kontrolllösung (CTRL-Lösung, Tabelle 2). Die CTRL-Lösung sollte den reinen sAHP-Strom von den sonstigen durch die Depolarisation ausgelösten Ionenströmen isolieren. Dafür wurden alle störenden am AP, mAHP und fAHP beteiligten, bekannten Ionenströme durch die Gabe entsprechender Pharmaka blockiert (Ionenkanalblocker, Tabelle 2).

Tabelle 2: Die für die CTRL-Lösung verwendeten Ionenkanalblocker und Blocker von synaptischen Rezeptoren mit Angabe der Hersteller, der Endkonzentration und der Zielkanäle und -rezeptoren.

CTRL Substanzen	Hersteller	Konzentration	Zielkanal/-kanäle	Referenzen
Ionenkanalblocker				
Tetrodotoxin (TTX)	Abcam, (Cambridge, UK)	0.5 μ M	spannungsabhängige Natriumkanäle ($Na_v1.1$ - $Na_v1.7$)	(Lee & Ruben, 2008)
Tetraethylammonium (TEA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)	10 mM	Ca^{2+} - und spannungsabhängige K^+ -Kanäle (u.a. BK-Kanäle)	(Beck et al., 1997; Wei et al., 2005)
Apamin	Sigma Aldrich	0.3 μ M	SK-Kanäle	(Beck et al., 1997; Wolfart et al., 2001)
4-Aminopyridin	Sigma Aldrich	400 μ M	spannungsabhängige Kaliumkanäle der Familie K_v1	(Higgs & Spain, 2011)
Synaptische Isolierung				
CNQX	Tocris Biosciences (Bristol, GB)	20 μ M	AMPA/Kainat-Kanäle	(Bourdeau et al., 2007; Honore et al., 1988)
Picrotoxin (PTX)	Sigma Aldrich	100 μ M	GABA _A Kanäle	(Bormann, 2000)
2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (AP5)	Abcam	50 μ M	NMDA Kanäle	(Ambrogini et al., 2004)

Die Zelle wurde ebenso von synaptischen Einflüssen isoliert (Synaptische Isolierung, Tabelle 2). Alle Substanzen wurden in Stocks angesetzt und jeden Experimenttag in einer Verdünnung von 1:1000 dem ACSF zugeführt. Diese Lösung wurde als Kontrolle (CTRL) für die pharmakologische Untersuchung des sAHP-Stroms verwendet. Die im Zuge der sAHP-Strom-Untersuchung verwendeten Substanzen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die CTRL-Lösung, sowie die Test-Lösungen wurden über einen Applikationsapparat in die Badkammer ein gewaschen.

Tabelle 3: Die für die sAHP-Stromuntersuchung verwendeten Substanzen mit Angabe des Herstellers, der Endkonzentration in der CTRL-Lösung (Tabelle 3) und der Zielkanäle. ↓= Blocker, ↑= Aktivator

CTRL Substanzen	Hersteller	Konzentration	Zielkanal/-kanäle bzw. Verwendung im Experiment	Referenzen
Bepridil-HCl	Sigma Aldrich	100 μ M	(u.a.) Slack-Kanäle ↓	(Yang et al., 2006)
Cadmium-chlorid	Sigma Aldrich	100 μ M	<i>high voltage gated</i> Calciumkanäle ↓	(Zhang et al., 2009b)
Cholinchlorid	Sigma Aldrich	125 mM	Natriumersatz ↓	(Huxley & Stampfli, 1951; Kim & McCormick, 1998)
Forskolin	Sigma Aldrich	20 μ M	Adenylatzyklase ↑	(Awad et al., 1983; Vogalis et al., 2003a)
Lidocain N-ethyl bromide	Sigma Aldrich	10 mM	spannungsabhängige Natriumkanäle ↓	(Hanck et al., 2009; Scholz & Vogel, 2000)
Nickelchlorid	Sigma Aldrich	2 mM	Breitband-Calciumkanal-blocker ↓	(Lee et al., 1999; Zamponi et al., 1996; Zhang et al., 2009b)
Ouabain	Sigma Aldrich	20 μ M	Na ⁺ /K ⁺ -Pumpe ↓	(Gorman & Marmor, 1974; Gulledge et al., 2013)
Tolbutamide	Sigma Aldrich	100 μ M	(u. a.) K _{ATP} -Kanäle ↓	(Erdemli & Krnjevic, 1994; Pelletier et al., 2000)
Quinidine	Sigma Aldrich	1 mM	(u. a.) Slack-Kanäle ↓	(Bhattacharjee et al., 2003)
CGP-37157	Tocris	10 μ M	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher (NCX) ↓	(Martinez-Sanchez et al., 2004)
Diazoxide	Tocris	100 μ M	(u. a.) K _{ATP} -Kanäle ↑	(Pelletier et al., 2000)
Nifedipine	Tocris	15 μ M	L-Typ Calciumkanäle ↓	(Shah & Haylett, 2000a)
Nimodipine	Tocris	10 μ M	L-Typ Calciumkanäle ↓	(Shah & Haylett, 2000a)
CPA	Biotrend (Köln)	10 μ M	Ca ²⁺ -ATPase ↓	(Lee et al., 2010)
Retigabine	Alomone labs (Jerusalem, Israel)	40 μ M	KCNQ-Kanäle (Aktivierung) ↑	(Main et al., 2000; Tzingounis & Nicoll, 2008)
XE991	Abcam	10 μ M	KCNQ-Kanäle (Blockierung) ↓	(Tzingounis & Nicoll, 2008)

2.1.5 *Uncaging* von Calcium

Um einen schnellen Konzentrationsanstieg von Calcium zu erhalten und die Reaktion der Zelle darauf zu beobachten, wurde in einigen Pilotexperimenten (Kapitel 3.2.2.4) die Methode des *Calcium Uncaging* verwendet, welche auf der lichtinduzierten Spaltung von photolabilen Derivaten basiert und zur räumlich und zeitlich präzisen Freisetzung von Calcium führt. Dafür kam der photolabile Calcium Chelator DM-Nitrophen (Synaptic Systems GmbH, Göttingen) zum Einsatz. 1.78 mM davon wurden der Pipettenlösung, welche kein EGTA und Magnesiumchlorid enthielt, beigefügt und über die *whole cell*-Konfiguration in die Zelle gebracht. Bei Applikation eines 500 ms langen UV-Lichtpulses

wurde das Calcium in der Zelle freigesetzt. In einer *voltage clamp*-Messung wurde die Zelle auf -55mV geklemmt um Ionenströme, welche durch die Freisetzung von Calcium ausgelöst wurden, zu messen.

2.1.6 Messprotokolle, Datenanalyse und Statistik

Die Patch-Clamp-Messungen wurden mit Patchmaster aufgezeichnet (HEKA Elektronik, Lambrecht) und mit der Software Fitmaster (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) und IgorPro (Wavemetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA) analysiert.

2.1.6.1 *Current clamp*

Im cc-Modus wurden direkt nach Etablierung des elektrischen Zugangs zur Zelle, noch in ACSF, einige passive und aktive Eigenschaften der Zellen charakterisiert um die Qualität und Vergleichbarkeit der Messungen zu beurteilen. Dazu gehörten das Ruhemembranpotential, die Membranzeitkonstante, sowie Eigenschaften der Aktionspotentialantwort auf einen Strompuls.

Die Datenspuren der Aufzeichnung des Membranpotentials wurden gemittelt und durch Fitmaster ermittelt. Die Membranzeitkonstante τ_m , ein Maß für die Geschwindigkeit der Umladung der Membran, ließ sich aus einem exponentiellen Anstieg und Abfall des Membranpotentials als Reaktion auf einen rechteckigen Strompuls ermitteln. Um den physiologischen AP-Entladungsphänotypen zu ermitteln, wurden depolarisierende Strompulse in die Zelle injiziert. Dabei wurde die Stärke des Strompulses stetig um 10-20 pA bis maximal 200 pA erhöht. Die APs, welche bei Erreichen des Schwellenpotentials ausgelöst wurden, wurden über die Parameter: Rheobase, also der geringste Strom der benötigt wird um ein AP auszulösen, die Dauer eines APs, die maximale Amplitude und den Schwellenwert charakterisiert.

Ein AP-*burst* ist in der vorliegenden Arbeit definiert als das Auftreten eines einzelnen APs oder einer Abfolge von mehreren APs, die nach Pulsinduktion in einem Zeitintervall von 0.5 s mit einem Inter-AP-Intervall von < 100 ms auftreten. Nach dem/n AP/APs erfolgt dabei eine langen Aktivitätspause bis zum Pulsende (> 1.5 s, Abb. 4 A). Hingegen wurde SFA hier definiert als eine Adaption der AP-Frequenz an die Länge und Stärke des Pulses, wobei das Intervall zwischen zwei APs bei zunehmender Stromstärke immer länger wird und auch Abstände von > 100 ms einnehmen kann. APs treten bei der SFA-Charakteristik (zunächst) auch noch nach dem Zeitintervall von 0.5 s nach Pulsinduktion auf. Neurone, welche zunächst SFA zeigen, können bei der Injektion von stärkeren Spannungspulsen auch einen *burst*-Phänotyp entwickeln. Sie zählen dann jedoch nicht zu den „Alles-oder-Nichts“-*burstern*, sondern wurden hier zu den Neuronen mit SFA-Charakteristik hinzugezählt.

2.1.6.2 *Voltage clamp*

Im *voltage clamp*-Modus wurde der Eingangswiderstand (R_{in}) ermittelt und der sAHP-Strom zunächst in ACSF-Lösung gemessen. Der instantane Eingangswiderstand wird durch die Beziehung zwischen dem injizierten Strom und daraufhin gemessenen

Membranpotentialunterschied definiert. Der R_{in} hängt von den Eigenschaften des Neurons, wie der Dichte der Ruhemembrankanäle und der Größe der Membranoberfläche, aber auch von der Wahl der Patch-Clamp-Methode ab.

Während des sAHP-Strom-Protokolls in der CTRL-Lösung wurde der instantane R_{in} kontinuierlich überprüft. Dafür wurde die Zelle zunächst auf -70 mV geklemmt, um dann mit einem kurzen 4 mV-Spannungspuls einen Ionenstrom auszulösen. Aus der gegebenen Spannung U und dem erhaltenen Ionenstrom I ließ sich nun der Widerstand R mit dem Ohm'schen Gesetz nach folgender Formel berechnen (II).

$$U = R * I$$

II

Im nächsten Schritt wurde die Zelle für vier Sekunden auf -55 mV geklemmt und anschließend mit einem 100 Millisekunden-langen Puls auf 10 mV depolarisiert. Zur Beobachtung des sAHP-Stroms wurde die Spannung für 12 s wieder auf -55 mV reguliert. Für die pharmakologische Charakterisierung des sAHP-Stroms wurde dieser in der CTRL-Lösung gemessen (Kapitel 2.1.4).

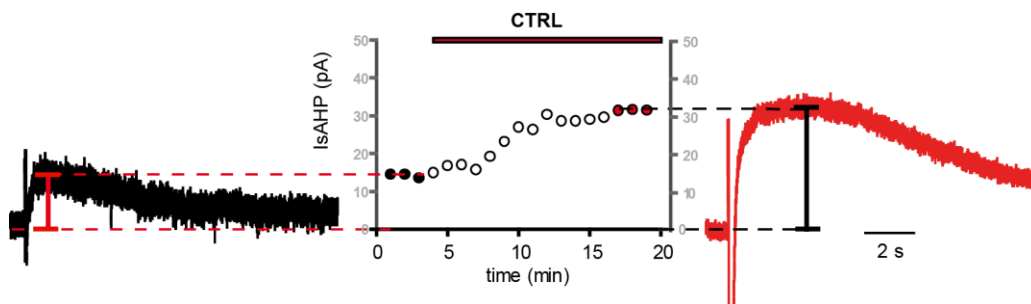


Abb. 7: Die Ausmessung der maximalen sAHP-Stromamplitude. Der Graph in der Mitte stellt einen zeitlichen Verlauf einer sAHP-Strom-Messung dar. Dabei sind die maximalen sAHP-Stromamplitudenwerte in pA (Kreise) gegen die Zeit (in min) aufgetragen. Der rote Balken oberhalb des Graphen zeigt den Anfang und die Dauer der Applikation der CTRL-Lösung an. Es konnte eine Zunahme der sAHP-Stromamplitude unter CTRL-Bedingungen beobachtet werden (Abb. 12). Vor der Applikation der CTRL-Lösung wurden drei sAHP-Stromwerte im ACSF aufgenommen und gemittelt (schwarze Punkte). Nach Einstellen einer neuen *baseline* wurden dann während der CTRL-Applikation drei Spuren gemittelt (rote Punkte). Die Spuren wurden in die Software IgorPro importiert und die maximale Amplitude durch das Setzen von zwei Cursors, dargestellt durch die gestrichelten Linien, ermittelt. Links neben dem Graphen ist die aus Igor-Pro exportierte, gemittelte Stromspur unter ACSF-Bedingungen zu sehen (schwarz) und rechts neben dem Graphen die sAHP-Stromspur, welche in der CTRL-Lösung aufgezeichnet wurde.

Die maximale Amplitude wurde von Fitmaster während des Experimentes ermittelt und auf einem Bildschirm angezeigt. Testlösungen wurden erst nach Einstellung einer stabilen *baseline* der sAHP-Stromamplitude appliziert. Für die Auswertung wurden nach Einstellung dieser *baseline* jeweils drei Spuren gemittelt (siehe Abb. 7). Die gemittelten sAHP-Stromamplituden wurden aus Fitmaster exportiert und via IgorPro analysiert. Die maximale Amplitude wurde mit einem Cursor manuell ausgemessen. Ein Cursor wurde mittig an der höchsten Stelle der sAHP-Stromspur platziert, der andere mittig der Stromspur bei -55 mV und die Differenz abgelesen (Abb. 7).

Für die Untersuchung der Ionenspezifität des sAHP-Stroms wurde das Standard-Protokoll durch eine Spannungsrampe von -55 bis -120 mV 1.5 s nach dem sAHP-Strom-auslösendem Puls ergänzt. Das Umkehrpotential wurde dabei unter zwei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (2 und 5 mM) in der ACSF-Lösung beobachtet. Dieses Experiment wurde von Dr. rer. nat Michael Stegen am Uniklinikum in Freiburg durchgeführt.

2.1.6.3 Auswertung und Statistik

Das *Liquid Junction Potential*, welches an der Patchpipettenspitze durch die unterschiedlichen Flüssigkeiten in der Pipette und Badlösung zustande kommt, liegt bei den für diese Arbeit verwendeten Lösungen bei 10 mV und wurde bei Spannungsmessungen abgezogen (Barry, 1994; Neher, 1992). Für die Auswertung wurden nur GCs mit einem Ruhepotential hyperpolarisierter als -70 mV und einem Eingangswiderstand von über 300 M Ω miteinbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte über die Software GraphPad (Version 4.0, San Diego, USA). Zur Bestimmung von statistisch signifikanten Differenzen zweier Datenreihen wurde für gepaarte Datenpunkte der Wilcoxon- und für unabhängige Datenpunkte der Mann-Whitney-Test angewendet. Dabei wurde von GraphPad die Irrtumswahrscheinlichkeit p errechnet, welche über die Einteilung in $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) das entsprechende Signifikanzniveau angibt. Bei Korrelationen wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 verwendet und anhand von Pearson's Regressionswerten die Signifikanz ermittelt. Der Buchstabe „n“ beschreibt die für die Statistik verwendete Anzahl der Messwerte. Die Abbildungen wurden in GraphPad, Adobe Illustrator (Version 2015.0.0), Adobe Draw (Version 4.0.1) und Gimp (2.8.18) erstellt.

2.1.7 Kainat-Modell

Zur Entwicklung von neuartigen antikonvulsiven Medikamenten wurden Tiermodelle entwickelt, die durch eine chemische oder elektrische Induktion eines *Status Epilepticus* (SE) eine chronische Epilepsie entwickeln. Um den sAHP-Strom in einem Epilepsie-Tiermodell zu untersuchen, wurde das in der Arbeitsgruppe von B. Onteniente etablierte (Suzuki et al., 1995) und über die Arbeitsgruppe von C. Haas (Heinrich et al., 2006) an unsere Arbeitsgruppe weitergegebene Mausmodell der intrahippocampalen Kainat (KA)-Injektion ausgewählt (Kirchheim et al., 2013; Young et al., 2009). Für dieses Modell wird der Glutamatagonist Kainat unilateral in den Hippocampus injiziert. Das führt zunächst zu einem *Status Epilepticus* aus dem nach ca. zwei Wochen spontane epileptische Anfälle resultieren, die mit den typischen Symptomen einer Ammonshorn Sklerose, einem CA1-Pyramidenzellsterben, Moosfasersprossung und GCD einhergehen. Die KA-Injektion wurde noch in Freiburg unter dem genehmigten Tierversuchsprojekt G11-86 durchgeführt (Regierungspräsidium Freiburg).

Kainat-Injektion. Für die Injektion von Kainat (Abcam plc, Cambridge, UK) wurden C57BL/6N-Mäuse (Charles River) im Alter von 7 Wochen verwendet. Das Tier wurde in

eine tiefe Narkose gelegt, die durch die intraperitoneale Injektion von einer Mixtur aus dem Analgetikum/Sedativum Xylazin (5 g/g Körpergewicht) und dem Anästhetikum Ketamin (100 g/g Körpergewicht) erreicht wurde. Die Maus wurde in einen stereotaktischen Apparat eingespannt, um eine gute Schädelfixierung und damit den Eingriffsort also den Hippocampus möglichst präzise zu treffen. Nach der Freilegung des Schädels wurde sich an den zusammenlaufenden Schädelnähten, dem Bregma, orientiert. Von dort aus wurde der Injektionspunkt -0.19 mm Richtung posterior und -1.5 mm nach rechts/links lateral gewählt (*Allens Brain Atlas*, Allen Brain Institute, Seattle, USA). Nach der Aufbohrung der Schädelplatte wurde eine Hamiltonspritze (Hamilton, Bounaduz, Schweiz) -0.19 mm dorsoventral in das Gehirn gefahren und über eine Mikropumpe (CMA/100, Carnegie Medicine, Stockholm) 50 nl einer 20 mM KA-Lösung (in 0.9 %iger Natriumchlorid-Lösung) in den rechten Hippocampus injiziert. Nach dem Zunaähen der Kopfhaut, wurde die Aufwachphase der Tiere überwacht. Ein SE ließ sich durch kreiselnde Bewegungen des Tieres und eine zum Schwanz hin gerichtete Zuwendung des Kopfes erkennen. Nach zwei Wochen wurde die Organentnahme an den epileptischen Tieren vorgenommen. Ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Epilepsie-Induktion ist die Körnerzelldispersion, welche sich stark von der kontralateralen Kontrollseite des Hippocampus abhob und wie beschrieben mit dem Auftreten spontan-fokaler Anfälle korreliert (Heinrich et al., 2006; Riban et al., 2002).

2.2 Etablierung der *Knock Down*-Technik

Die pharmakologischen Ergebnisse können mit einem so genannten *Knock Down*, einer Herunterregulierung der Expression von ausgewählten Ionenkanälen, verifiziert werden. Dafür musste zunächst die Kombination von organotypischen Schnittkulturen mit molekular- und zellbiologischen Methoden am Institut für Physiologie in Rostock etabliert werden. Auf molekularbiologischer Ebene sollte die RNA-Interferenz (RNAi) verwendet werden (Kapitel 2.2.1). Als Ziel-Gewebe wurden organotypische Schnittkulturen gewählt (Kapitel 2.2.2). Für den Transfer der RNA in die Zellen wurden zwei Methoden getestet: 1. der Transfer via Lipofectamine und 2. der Transfer via Adenovirus (Kapitel 2.2.3).

2.2.1 Molekularbiologie

RNAi entwickelte sich zu einer weit verbreiteten Technik, nachdem gezeigt werden konnte, dass kurze, doppelsträngige RNA-Sequenzen von ca. 20 Basenpaaren für einen effektiven *Knock Down* entsprechender Zielproteine in Säugerzellen verwendet werden können (Elbashir et al., 2001). Sie ist ein erfolgreiches Werkzeug zur Untersuchung von Genen und den zugehörigen Proteinen. Die Hoffnung liegt außerdem auf späteren therapeutischen Einsätzen (Ozcan et al., 2015). RNAi ist eigentlich ein physiologischer Mechanismus und kann eine Blockierung der Genexpression auf verschiedenen Ebenen bewirken, so kann RNAi über eine DNA-Methylierung und damit der Verhinderung der Transkription (Kawasaki & Taira, 2004), einer Blockade der mRNA oder einem Abbau dieser, und damit der Verhinderung der Translation, wirken. Dafür kommen kleine ungefähr 22 Nukleotid (nt)-lange RNA-Stränge zum Einsatz. RNAi kann über zwei

verschiedene RNA-Typen vermittelt werden. Es wird zwischen si (*small interfering*) RNA oder mi (*micro*) RNA unterschieden, die sich vor allem aufgrund ihres Ursprungs voneinander abgrenzen lassen. siRNA entsteht aus freier doppelsträngiger RNA/DNA, wohingegen miRNA auf einem eigenen ca. 70 nt langen Vorläufer Gen, der primären miRNA (pri-miRNA), kodiert wird (Ambros et al., 2003). Diese pri-miRNA ist speziell gefaltet und bildet so genannte Haarnadelstrukturen (engl. *hairpin*) aus, welche die Träger der funktionellen RNA sind und im Zellkern von dem Enzymkomplex Drosha abgetrennt werden. Die so entstandene *precursor transcript*-miRNA (pre-miRNA) wird durch das Enzym Exportin aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Hier wird die pre-miRNA von der RNase III *Dicer* prozessiert, wobei aus einem Teil der Haarnadelstruktur die ca. 22 nt lange miRNA entsteht (Bernstein et al., 2001). Der mRNA-bindende Führungsstrang der miRNA wird dann in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* RISC integriert und kann durch eine teilweise komplementäre Anlagerung an die Ziel-mRNA, die Translation der mRNA unterdrücken oder aber bei präziser komplementärer Bindung diese abbauen. Die miRNA soll auch für den *Knock Down* von potentiellen sAHP-Strom-Kanalkandidaten zum Einsatz kommen.

Um einen *Knock Down* eines ausgewählten Ionenkanals zu erzielen, muss eine (pre-) miRNA-kodierende DNA über einen Gentransfer in die Zielzellen gebracht werden. Für den Transfer sollte eine modifizierte bakterielle Plasmid-DNA verwendet werden, da diese im Gegensatz zu linearer DNA effektiver transfiziert und nicht von Exonukleasen im Zytoplasma zersetzt werden kann (Halls & Cooper, 2017). Im Laufe der Experimente wurden zunächst zwei miRNA-kodierende DNA-Plasmide mit Hilfe der Vektoren: pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR (Kapitel 2.2.1.2) und pAd/CMV/EmGFP-miRTM (Kapitel 2.2.1.3) kloniert. Ersterer kam für den Transfer via Lipofectamine zum Einsatz, letzterer für den Transfer via Adenovirus. Zur Unterscheidung werden die Transportvehikel zur Übertragung von bestimmten DNA-Sequenzen in dieser Arbeit als DNA-Vektoren bezeichnet, während die zirkuläre DNA mit eingebautem Transgen (in diesem Fall die miRNA-kodierende Sequenz) DNA-Plasmid genannt wird. Das Kapitel ist in zwei Abschnitte gegliedert: die Klonierung der Plasmid-DNA mit Hilfe der BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi-Technik und die molekularbiologischen Standardmethoden, die für die Klonierung verwendet wurden.

2.2.1.1 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi-Technik

Die BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi-Technik von Invitrogen ist eine Methode zur Einbringung von miRNA-kodierenden Sequenzen in einen DNA-Vektor. Zusammen mit dem ‚BLOCK-iTTM RNAi Designer‘ (Invitrogen) verspricht sie einen im Vergleich zu anderen Techniken hohen *Knock Down*-Erfolg des Zielproteins von mindestens 70% (Mhyre et al., 2009; Wang et al., 2009). Des Weiteren stellt die Technik die Möglichkeit, über den Expressionsvektor pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR mehrere miRNAs über ein einziges Transkript in die Zelle zu schleusen und zu exprimieren. Damit kann die Expression von mehreren Kanaluntereinheiten gleichzeitig ausgeschaltet werden. Die (pre-) miRNA-kodierenden Sequenzen werden über den ‚BLOCK-iTTM RNAi Designer‘ von Invitrogen dahingehend ausgewählt, dass die miRNA eine 100%-ige Homologie zur

Ziel-mRNA-Sequenz aufweist, um einen Abbau der mRNA und damit einen optimierten *Knock Down* zu erzielen. Außerdem besitzen diese Enzym-Schnittstellen für einen schnellen Einbau in beliebige Vektoren von Invitrogen. Somit war es in dieser Arbeit möglich zunächst den Transfer des pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR via Lipofectamine zu testen, um dann im nächsten Schritt mit wenig Aufwand den adenoviralen pAd/CMV/EmGFP-miR™ zu klonieren und den Transfer via Adenoviren zu testen.

Invitrogen stellt für diese Technik ein BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expressions Vector Kit (Invitrogen, Katalog Nr.: K493600). Dieses Kit enthält einen DNA-Expressionsvektor, der durch seinen *Cytomegalovirus-immediate early*-Promotor (CMV) eine starke Genexpression in Säugerzellen verspricht (Xia et al., 2006). Die Ziel-DNA kann durch komplementäre Schnittstellen leicht hinter den Promotor eingebaut werden. Durch die Ko-Expression von emGFP ist die Expression und Wirkung der miRNA an das Erscheinen eines GFP-Signals gekoppelt.

Oligonukleotide. Die miRNA-kodierenden Sequenzen wurden als zwei komplementäre DNA-Einzelstränge (*top* und *bottom*), so genannte Oligonukleotide erworben (Invitrogen). Die Oligonukleotide wurden zunächst für den *Knock Down* von KCNQ2- und 3-Untereinheiten und die K_{ir}6.1 (Kcnj8)- und 6.2 (Kcnj11)-Untereinheiten des K_{ATP}-Kanals mit Hilfe des ausgezeichneten BLOCK-iT™ RNAi Designer's (Invitrogen, Darmstadt) erstellt. Je Kanalkandidaten wurden vier verschiedene miRNA-kodierende Sequenzen ausgewählt um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass mindestens eine der miRNAs zu einem *Knock Down* des Zielgens führt. In Tabelle 4 sind die Sequenzen (5' nach 3') von zwei pre-miRNA-Oligonukleotiden (Primer) für den *Knock Down* von KCNQ2 und K_{ir}6.2 aufgelistet.

Tabelle 4: Die miRNA-kodierenden Einzelstrang-Sequenzen (*top* und *bottom*) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP}-Untereinheit K_{ir}6.2 (Kcnj11) und an die KCNQ2-Untereinheit.

Primer Name	Sequenz
Mmi512452_top_Kcnj11	TGC TGT GAC AAT GAT CTC CAG GTC CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGG ACC TGG ATC ATT GTC A
Mmi512452_bot_Kcnj11	CCT GTG ACA ATG ATC CAG GTC CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGG ACC TGG AGA TCA TTG TCA C
Mmi512536_top_Kcnq2	TGC TGA AAT TCT GCA GCT TGC GGT AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CTA CCG CAC TGC AGA ATT T
Mmi512536_bot_Kcnq2	CCT GAA ATT CTG CAG TGC GGT AGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CTA CCG CAA GCT GCA GAA TTT C

Die restlichen Oligonukleotid-Sequenzen wurden zwar bereits in einen Expressionsvektor kloniert, kamen aber für die Gentransfer-Experimente noch nicht zum Einsatz und sind hier daher im Anhang aufgelistet (ab S.101). Um die Oligonukleotide in

den Expressionsvektor einzubauen, mussten die komplementären Einzelstränge (*top* und *bottom*) zunächst aneinandergelagert werden (*Annealing*, Abb. 8 A). Das *Annealing* erfolgte nach Protokoll des Herstellers (Invitrogen). Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten zentrifugiert und auf eine Ziel-Konzentration von 10 nM runter verdünnt.

2.2.1.2 Klonierung des miRNA-kodierenden DNA-Plasmids

Nach der Hybridisierung wurden die Doppelstränge über die angelagerten 5'- und 3'-Nukleotidüberhänge mittels einer Ligase (BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits: emGFP) direkt in den Expressionsvektor pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR kloniert (Abb. 8). Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert und die positiven Klone (mit enthaltener Ziel-DNA) über das Antibiotikum Spectinomycin selektiert (Bakterien, welche das Plasmid nicht aufgenommen haben werden abgetötet). Die ausgewählten Bakterienkolonien wurden zur Vervielfältigung in Flüssigmedium (LB Broth, Sigma Aldrich) angezüchtet und die enthaltende Plasmid-DNA mittels Mini- und Midi-Präparation (Kapitel 2.2.1.4) isoliert. Nach jeder Präparation wurde die DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen inkubiert und die resultierenden DNA-Fragmente über die Gelelektrophorese nach Größe getrennt (Kapitel 2.2.1.4). Der Vergleich dieser mit einem Größenstandard zeigte ob die DNA-Fragmente die erwartete Größe hatten. Nachdem die pcDNA6.2-miRNA Plasmide fertiggestellt waren, wurde die DNA zur Sicherheit von der Firma SeqLab sequenziert.

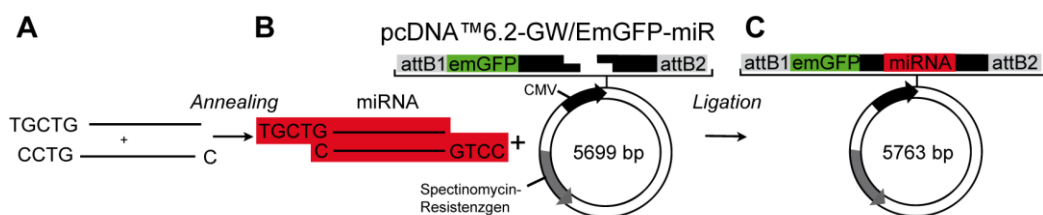


Abb. 8: Die Klonierung der miRNA-kodierenden Sequenz in den Expressionsvektor pcDNA™6.2-GW/EmGFP miR. (A) Die miRNA-kodierenden Sequenzen wurden als zwei komplementäre Einzelstränge (*top* und *bottom*), so genannte Oligonukleotide erworben. (B) In einer *Annealing*-Reaktion (Kapitel 2.2.1.4) wurden die Einzelstrang-Oligonukleotide (*top* und *bottom*) komplementär aneinander gelagert. Dabei entstehen Nukleotidüberhänge. Der linearisierte pcDNA™6.2-GW/EmGFP miR besitzt ebenso Nukleotidüberhänge, welche an die miRNA-flankierenden Regionen (schwarze Balken) angrenzen und zusammen mit dem emGFP-kodierenden Gen durch die attB1- und attB2-Enzymerkennungsstellen flankiert werden. Die austauschbare Genkassette sitzt vor dem CMV-Promotor (schwarzer Pfeil). Der Expressionsvektor enthält außerdem ein Spectinomycin-Resistenzgen (grauer Pfeil) zur Selektion der positiven Klone. (C) Die Nukleotidüberhänge der doppelsträngigen miRNA-kodierenden DNA sind komplementär zu den Überhängen des linearisierten pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR und wurden über eine Ligase-Reaktion mit diesen verbunden.

Klonierung der dsOligos in den Expressionsvektor via Ligation. Die Klonierung der doppelsträngigen miRNA-kodierenden DNA (dsOligos) in den Expressionsvektor erfolgte über eine Ligase-Reaktion (Abb. 8 B+C). Die T4-Ligase verknüpft kovalent glatte oder überstehende, komplementäre DNA-Fragmente. Die Reaktion wurde dabei nach Herstellerangaben angesetzt, für 5 Minuten inkubiert und zur Transformation von *E. coli* auf Eis gestellt.

Linearisierung des pcDNA6.2-miRNA Plasmids. Für die Gateway Reaktion wurde das pcDNA6.2-miRNA Plasmid zunächst linearisiert. Diese Linearisierung erfolgte über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym Eco521 (Thermo Fisher Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.3 Klonierung des adenoviralen DNA-Plasmids

Da der Gentransfer des pcDNA6.2-miRNA Plasmids via Lipofectamine keine brauchbaren Ergebnisse lieferte (Kapitel 3.3.1), sollte die miRNA-kodierende DNA im nächsten Schritt über einen Adenovirus in die GCs gebracht werden. Die Einbringung von genetischem Material in Zellen über einen Virus wird Infektion oder Transduktion genannt. Virale Vektoren repräsentieren ein wichtiges Werkzeug für den *in vitro*- und *in vivo*-Gentransfer (Vannucci et al., 2013). Ein Vorteil von Adenoviren ist, dass diese im Gegensatz zu anderen Viren auch sich nicht teilende Zellen infizieren (Hitt et al., 1997). Für den Einsatz im Labor werden die Vektoren meistens von dem humanen Adenovirus vom Typ 5 (Ad5) abgeleitet und bestimmte DNA-Fragmente entfernt, so dass daraus Replikations-defiziente Adenoviren resultieren (Bett et al., 1993).

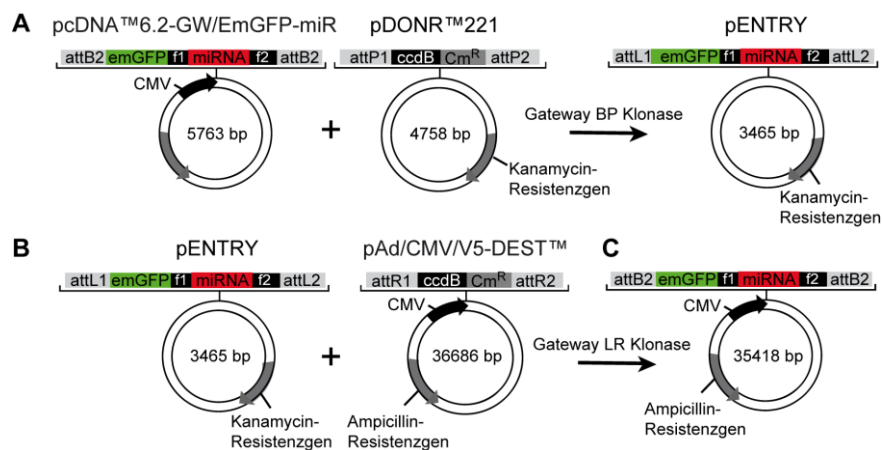


Abb. 9: Die Klonierung der adenoviralen Plasmid-DNA. (A) Das linearisierte pcDNATM6.2-miRNA Plasmid wurde zusammen mit dem Vektor pDONORTM221 und einer BP-Klonase inkubiert. (B) Dadurch wurden die Sequenzen, die zwischen den att-Erkennungsstellen liegen, ausgetauscht, woraus ein pENTRY-Plasmid mit attL-Erkennungsstellen resultierte. Nach einer Transformation in *E. coli*-Bakterien vermehrten sich nur diejenigen Zellen, welche die miRNA-kodierende DNA aufgenommen hatten, da solche mit *ccdB*-Gen nicht überlebensfähig waren. Außerdem wurde dem Nährmedium Kanamycin beigesetzt, so dass Bakterien ohne das entsprechende Resistenzgen zugrunde gingen. In einer zweiten Reaktion wurde das pENTRY-Plasmid zusammen mit dem pAd/CMV/EmGFP-miRTM-Vektor und einer LR-Klonase inkubiert, wobei die Sequenzen zwischen den attL- und attR-Erkennungsstellen ausgetauscht wurden. Nach einer erneuten Transformation in *E. coli* wurden die positiven Klone über den Ampicillin-Einsatz im Nährmedium selektiert. f1, f2 = miRNA-flankierende Sequenzen. *ccdB* = letales Gen, kodiert ein Toxin des *ccd* (engl. control of cell death) Systems von *E. coli* F-Plasmiden. Cm^R = Chloramphenicol Resistenz Gen zur Vervielfältigung in *ccdB* Survival *E. coli* Bakterienstämmen.

Für die Klonierung eines adenoviralen Plasmids (Abb. 9) kann die miRNA-kodierende Sequenz im pcDNA6.2-miRNA Plasmid mittels Gateway® Vector Conversion System (s.u.) von Invitrogen schnell und effizient in den pAd/CMV/EmGFP-miRTM kloniert werden.

Gateway® Vector Conversion-System. Das Gateway® Vector-System ist eine Klonierungsmethode, welche die spezifischen Restriktionsstellen von der Bakteriophage Lambda (Landy, 1989) nutzt, um ein Gen mit nur ein bis zwei Reaktionen von einem DNA-Plasmid in ein anderes zu schleusen (Rekombination).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die miRNA-kodierende Sequenz aus dem pcDNA6.2-miRNA Plasmid in den pAd/CMV/EmGFP-miR™-Vektor eingebaut werden. Die miRNA-kodierende Sequenz wurde, zusammen mit dem emGFP-Gen (Expressionskassette), in dem pcDNA6.2-miRNA Plasmid von so genannten *attB*-Restriktionsstellen eingegrenzt, welche von einer BP (Bakteriophage Lambda)-Klonase erkannt werden. Das *attB*-Plasmid wurde nun zusammen mit der BP-Klonase und einem Vektor mit *attP*-Erkennungsstellen in ein Reaktionsgefäß gebracht. Dabei wurden die Sequenzen, die zwischen den *attB*- in dem Plasmid und den *attP*-Erkennungsstellen in dem Vektor liegen ausgetauscht (BP-Reaktion). Durch diese Reaktion konnte die Expressionskassette zunächst in ein Zwischenprodukt eingebaut werden, welches *pENTRY*-Plasmid genannt wird. Durch die BP-Reaktion entstanden außerdem neue Erkennungsstellen in dem Plasmid: die *attR*-Stellen. In einer zweiten Reaktion und dem Einsatz einer LR-Klonase, konnte die Sequenz zwischen den *attR*-Stellen in dem *pENTRY*-Plasmid mit einer Sequenz zwischen den *attL*-Stellen eines Zielplasmids ausgetauscht werden. Ein großer Vorteil der Methode ist die Selektion mittels des *ccdB*-Gens, welches zwischen den *attP*-Stellen in dem pDONR™221 und den *attL*-Stellen im Zielvektor liegt und zusätzlich zu den Antibiotika für eine Selektion derjenigen *E. coli*-Klone sorgt, die das richtige DNA-Plasmid aufgenommen haben (Positiv-Klone). Das *ccdB*-Gen produziert ein Toxin, welches letal für Bakterien ist. Somit starben diejenigen Bakterien, die nach der BP-Reaktion den Expressionsvektor mit dem *ccdB*-Gen aufgenommen hatten, während die Bakterien, die das *pENTRY*-Plasmid mit miRNA-kodierender DNA aufgenommen hatten, überlebten und Kolonien bildeten. Für die Reaktionen kam der Gateway® BP Clonase® II Enzym Mix und der Gateway® LR Clonase® II Enzym Mix von Invitrogen zum Einsatz. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.4 Molekularbiologische Standardmethoden für die Plasmid-Klonierung

Für die Klonierung der Plasmid-DNA kamen folgende molekularbiologische Standardmethoden zum Einsatz:

Transformation in *Escherichia coli* und Isolierung der DNA. Die DNA (Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.3) wurde zur Vervielfältigung in *E. coli*-Zellen vom Typ: One Shot®TOP10 *Chemically Competent E.Coli* (Invitrogen) transformiert. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert und für die Transformation auf Eis aufgetaut. 50 µl *E. coli* wurden zur Transformation von 5 µl Ligationsansatz verwendet. Nach dem Zusammenfügen der Komponenten kamen die Proben für 30 Minuten auf Eis. Daraufhin folgte zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen ein 30 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C. Nach zwei Minuten auf Eis und Zugabe von 500 µl LB-Medium (Sigma Aldrich), wurde die Probe für eine Stunde bei 37 °C in einem Schüttler (300 rpm) inkubiert.

Tabelle 5: Auflistung der DNA-Vektoren und der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen zur Selektion von positiven *E. coli* Klonen auf Agar Platten.

DNA-Plasmid	Antibiotika
pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP miR	50 µg/ml Spectinomycin
pDONR TM 221	50 µg/ml Kanamycin
pAd/CMV/EmGFP-miR TM	50 µg/ml Ampicillin

Nach der Inkubation wurde der Ansatz auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz (Tabelle 5) ausplattiert und für 24 Stunden in einen Brutschrank gestellt. Pro Platte wurden je zwei Kolonien zur Aufbereitung (Mini- und Midiprep) in flüssigem LB-Medium angeimpft.

Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini- und Midi-Präparation). Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinen Kulturmedium-Volumina (2 ml) wurde folgendes am Institut für Physiologie etablierte Protokoll (erstellt von Dr. Steffen Müller) verwendet. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 6 erläutert.

Nach der Auswahl einer Bakterienkolonie von der Agarplatte wurde diese in ein steriles Reagenzglas mit LB-Medium und Antibiotikumzusatz (Tabelle 5) überführt. Über Nacht wurde die Kultur bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Für die Präparation wurden 2 ml der Übernachtskultur in ein Eppi pipettiert und für drei Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 100 µl der Lösung 1 zum Pellet hinzu gegeben. Auf einem Schüttler wurde das Pellet resuspendiert und mit 200 µl der Lösung 2 versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur, wurde 150 µl der Lösung 3 dazu pipettiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte die Phenol-Chloroform-Extraktion. 500 µl des Roti®Phenol/Chloroform/Isoamylalkohols (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden zu der Probe hinzugegeben. Die Probe wurde daraufhin eine Minute lang kräftig geschüttelt, für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert und die wässrige Phase in neues Eppi (1.5 ml) überführt. Zur DNA-Präzipitation wurden 500 µl Isopropanol (Carl Roth GmbH) dazu pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde daraufhin für 5 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %-igen Ethanol (Carl Roth GmbH) versetzt. Die Lösung wurde dann für 5 min bei 20000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20-40 µl Tris-RNase (1:100 RNase:Tris, Thermo Fisher Scientific) aufgenommen und für 10 min im Schüttler inkubiert. Eine Deaktivierung der RNAase folgte für 5 min bei 68 °C. Die Probe wurde am Ende nochmal kurz abzentrifugiert und entweder direkt für eine Analyse mittels eines Kontrollverdaus via Restriktionsendonukleasen verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt. Nach dem Kontrollverdaus wurde der Rest des Mediums erneut mit einem größeren Volumen (30 ml) angeimpft. Daraufhin wurde die Plasmid-Isolation mit dem Kit PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 6: Eine Auflistung der für die Plasmidisolation (Mini Präparation) verwendeten Lösungen.

Lösung I	20 mM Tris 20 mM EDTA dH ₂ O
Lösung II	1 % SDS 0.2 N NaOH dH ₂ O
Lösung III	3 M Kaliumacetat pH 5.0, mit Essigsäure eingestellt dH ₂ O
Tris Puffer	10 mM Tris dH ₂ O

Nach der Auswahl einer Bakterienkolonie von der Agarplatte wurde diese in ein steriles Reagenzglas mit LB-Medium und Antibiotikumzusatz (Tabelle 5) überführt. Über Nacht wurde die Kultur bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Für die Präparation wurden 2 ml der Übernachtskultur in ein Eppe pipettiert und für drei Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 100 µl der Lösung 1 zum Pellet hinzu gegeben. Auf einem Schüttler wurde das Pellet resuspendiert und mit 200 µl der Lösung 2 versetzt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur, wurde 150 µl der Lösung 3 dazu pipettiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte die Phenol-Chloroform-Extraktion. 500 µl des Roti®Phenol/Chloroform/Isoamylalkohols (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden zu der Probe hinzugegeben. Die Probe wurde daraufhin eine Minute lang kräftig geschüttelt, für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert und die wässrige Phase in neues Eppe (1.5 ml) überführt. Zur DNA-Präzipitation wurden 500 µl Isopropanol (Carl Roth GmbH) dazu pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde daraufhin für 5 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %-igen Ethanol (Carl Roth GmbH) versetzt. Die Lösung wurde dann für 5 min bei 20000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20-40 µl Tris-RNase (1:100 RNase:Tris, Thermo Fisher Scientific) aufgenommen und für 10 min im Schüttler inkubiert. Eine Deaktivierung der RNAase folgte für 5 min bei 68 °C. Die Probe wurde am Ende nochmal kurz abzentrifugiert und entweder direkt für eine Analyse mittels einer Kontrollverdau via Restriktionsendonukleasen verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt. Nach dem Kontrollverdau wurde der Rest des Mediums erneut mit einem größeren Volumen (30 ml) angeimpft. Daraufhin wurde die Plasmid-Isolation mit dem Kit PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Photometer bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Messung entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml DNA. Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Information über die DNA-Reinheit und sollte bei einer hochreinen DNA-Präparation zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

DNA-Gelelektrophorese. Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleotidsträngen (Oligonukleotide und verdauten DNA-Plasmiden) nach Größe

verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1-3 %-igen Agarosegelen mit Midori Green Advance (Nippon, Genetics Europe, Düren). In einer Trennkammer, gefüllt mit 1 %-igem Tris-Acetat-EDTA-Puffer, wurden die mit 2% 1x-Probenpuffer (Orange Loading Dye 6x, Thermo Scientific™) versetzten DNA-Proben in die Taschen des Gels pipettiert und unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes von 120 V für ca. 30 Minuten aufgetrennt. Als Größenstandard diente der GeneRuler 1 kb-DNA-Ladder (deut. „Leiter“) (Thermo Scientific™). Unter ultraviolettem (UV) Licht (302 nm) wurden die Banden sichtbar gemacht werden.

Schnelle Sequenzanalyse. Zur schnellen Charakterisierung der klonierten DNA wurde diese von spezifischen Restriktionsenzymen in DNA-Fragmente zerlegt. Die Enzyme wurden über die molekularbiologische Software Serial Cloner 2.6 ausgewählt. Für die Sequenzanalyse kamen verschiedene Sequenz-spezifische Restriktionsendonukleasen der Firma NEW ENGLAND BIOLABS® Inc zum Einsatz. Es wurde je Mikrogramm DNA mindestens eine Unit der jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) eingesetzt und der entsprechende Reaktionspuffer hinzugegeben. Der Restriktionsverdau erfolgte für eine bis 12 Stunden bei 37 °C und 300 rpm in einem Thermomixer. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden dann mit Hilfe der Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.4) nach Größen aufgetrennt.

Sequenzierung. Die fertigen Expressionsvektoren wurden zur Sequenzanalyse in das SeqLab-Labor (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) geschickt. Die DNA-Sequenzierung wurde mit einer Konzentration von 100 ng/µl der aufgereinigten Plasmid-DNA und mit den entsprechenden Primern, welche mit dem BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit mitgeliefert wurden, durchgeführt.

2.2.2 Organotypische Schnittkulturen

Die miRNA-kodierende DNA sollte im nächsten Schritt in GCs von sogenannten organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen (OHSCs) geschleust werden. Organotypische Schnittkulturen sind Hirnschnitte, die dem Gehirn entnommen werden und unter bestmöglichen physiologischen Bedingungen in Kultur weiterleben. Strukturelle und synaptische Organisation des Originalgewebes, sowie die native Proteinausstattung bleiben dabei erhalten (Humpel, 2015). Für manche Fragestellungen stellen OHSC eine gute Alternative für *in vivo*-Tierversuche dar, die in der neurowissenschaftlichen Forschung zum einen mit einem großen Aufwand, aber vor allem mit einem hohen Verbrauch und mehr oder weniger großem Leiden der Versuchstiere einhergehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass Langzeitstudien mit wiederholter Gabe von Versuchssubstanzen vorgenommen werden können und die ausgelösten Veränderungen des Gewebes oder einzelner Zellen direkt und jeden Tag studiert werden können. 1962 konnte zum ersten Mal Gewebe, aus der Hypophyse einer Ratte, in Kultur gezogen werden. Seitdem konnte die Methode weiter ausgefeilt und die verschiedensten Gewebearten kultiviert werden (Giesing et al., 1975; Jonakait et al., 1988; Robertson et al., 1997; Whetsell et al., 1981; Wray et al., 1993). 1991 beschrieb Stoppini et al. die Kultivierung auf semipermeablen Membranen (Stoppini et al., 1991).

Hierbei werden die Hirnschnitte auf eine erhöhte Membran gelegt, die von unten mit dem Zellkulturmedium und auf der Oberfläche mit der O₂/CO₂ Begasung des Brutschranks in Kontakt kommt. Die Poren der Membran sind vergleichbar mit der Blut-Hirn Schranke *in vivo*. Die Wahl der Porengröße bestimmt welche Moleküle passieren und von den Zellen aufgenommen werden können. OHSC gelten als besonders geeignet, da der Hippocampus in Lamellen unterteilt ist und die intrinsischen, neuronalen Organisationen und Verbindungen bei einer Präparation, die senkrecht zur Längsachse stattfindet, weitgehend erhalten bleiben können (Zimmer & Gähwiler, 1984). Bei der Präparation beschädigte Gewebefragmente degenerieren, wobei sich die restlichen Zellverbände reorganisieren. In den zunächst verwendeten, isolierten Hippocampusschnitten gehen jedoch die Afferenzen des *Tractus perforans* aus dem EC verloren, so dass die Moosfasern der GCs sich neu organisieren und in die innere Molekularschicht des DG einwandern (Zimmer & Gähwiler, 1984). Um diese Desorganisation weitgehend zu umgehen, wurden im Verlauf der Experimente Schnittkulturen von der entorhinal-hippocampalen Formation angefertigt werden, wobei die Verbindungen von entorhinalen Fasern zu den GCs des Hippocampus bestehen blieben. Diese OSHC-Präparation vermittelte mir Dr. Alexander Drakew vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg.

2.2.2.1 Präparation von Organotypischen Schnittkulturen

Vor der Präparation von organotypischen, entorhinal-hippocampalen Schnittkulturen wurden alle Präparationswerkzeuge und Arbeitsflächen desinfiziert. Das Präparationsbesteck wurde nach jeder Benutzung in Isopropanol getaucht und abgeflammt. Präparationsmedium wurde kaltgestellt und das Kulturmedium angesetzt. 6-Well-Zellkulturplatten (Merck Millipore, Darmstadt) wurden jeweils mit 1.2 ml Kulturmedium befüllt und bei 37 °C mit 95% O₂ und 5% CO₂ Begasung inkubiert. P4-5 Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und dekapitiert. Das Gehirn wurde in Präparationsmedium in einer auf einem kalten Aluminiumblock stehenden Petrischale aus dem Schädel präpariert. Ein Teil des Frontallappens wurde entfernt und das Gehirn am Cerebellum fixiert. Entlang der longitudinalen Fissur wurde ein flacher Schnitt runter bis zum *Corpus callosum* (Balken) gemacht, ohne diesen durchzutrennen. Von hier aus wurde das Skalpell zwischen Zwischenhirn und zerebralen Cortex entlanggeführt und die Cortexschale abgetrennt. Der Schritt wurde mit der anderen Hemisphäre wiederholt. Die Cortexschale wurde auf die konvexe Seite gelegt. Hippocampus, EC, sowie der septale bzw. temporale Pol wurden ausfindig gemacht. Um die Vollständigkeit des *Tractus perforans* zu gewährleisten, wurde der Hippocampus mit dem temporalen Abschnitt des EC über mehrere Schnitte rausgetrennt. Der erste Schnitt wurde mittig der Längsachse des Hippocampus von der lateralen Cortexseite aus nach medial bis zum Hippocampus gesetzt. Mit dem zweiten Schnitt wurde der septale Pol abgetrennt. Der dritte Schnitt erfolgte entlang des Hippocampus und trennte den septalen, nicht benötigten Teil des EC ab. Der Hippocampus wurde am Seitenventrikel leicht angehoben, das Skalpell unter dem Hippocampus in Position gebracht und mit einem Schnitt das Gewebe am EC in einem 30-Grad-Winkel abgetrennt. Der Hippocampus lag nun, verbunden mit dem temporalen Pol des ECs, isoliert vor. Das Gewebe wurde anschließend auf einem Tissue Chopper

(McIlwain Tissue-Chopper, Model TC752-PD, NPI electronic, Tamm) platziert. Hierbei lag die konvexe Seite des EC zur Rasierklinge gerichtet.

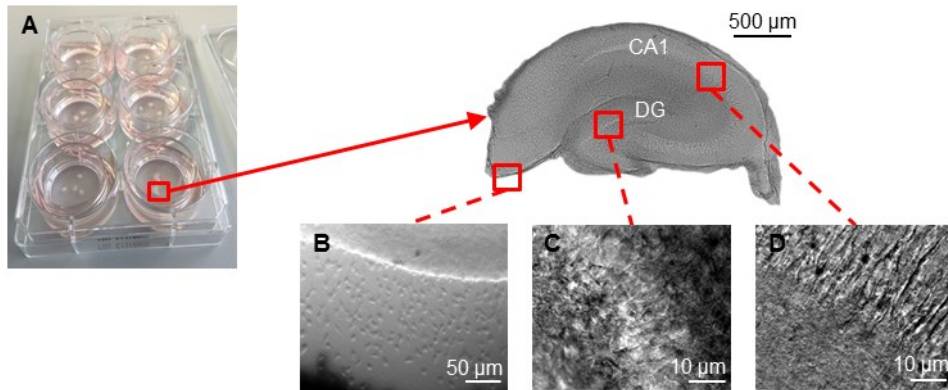


Abb. 10: Organotypische Schnittkulturen und ihre vitalen Eigenschaften. (A) Das Foto zeigt eine 6-Well-Zellkulturplatte mit auf Membraninserts wachsenden OHSC's. Mittig ist eine Aufnahme einer organotypischen Schnittkultur platziert, die unter dem Lichtmikroskop aufgenommen wurde. Die vitalen Anzeichen einer OHSC sind in (B-D) aufgeführt. Dazu gehören: (B) Die typischen Ausläuferzellen am Rande der Kultur, die auf ein Festwachsen an der Membran schließen lassen, (C) ein intaktes, gut abgrenzbares Körnerzellband, sowie (D) ein intaktes Pyramidenzellband.

Das Gewebe wurde senkrecht zu seiner Längsachse in 300 µm dicke Hirnschnitte geschnitten. Nach dem Schneiden, wurden die Schnitte mit Flüssigkeits-benetzten Spateln aufgenommen und mittels Scherkräfte voneinander getrennt. Nach der Überführung der Schnitte in eine Petrischale, erfolgte die Selektion der Schnitte.

Tabelle 7: Auflistung der Zellkulturmedien für die Präparation und Kultivierung von OHSCs. Das Präparationsmedium enthielt nur MEM (engl. *minimal essential medium*) mit HEPES und GlutaMAX™ Zusatz. Das Kulturmedium enthielt zusätzlich BME, FKS und Glucose.

Lösungen	Substanzen (ml)	Hersteller
Präparation	100 MEM, HEPES, GlutaMAX™ Supplement	Invitrogen
Kultur	50 MEM, HEPES, GlutaMAX™ Supplement, 25 BME (engl. basal medium eagle) 25 FKS (fötales Kälberserum), 3.125 20%-ige Glucose Lösung (in NaCl)	Invitrogen Invitrogen Bio&Sell

Dabei wurde auf den Zustand der Schnitte, die Lage des ECs zum Hippocampus und die Form des Körnerzellbandes (eher C-Förmig als V-Förmig) geachtet. Damit konnten weit dorsal und ventral liegende Schnitte aussortiert werden, da hier die Verbindung zum *Tractus Perforans* nicht mehr vollständig erhalten ist. In der Regel konnten drei Schnitte pro Hemisphäre mit einem Spatel auf die Membranen (Millicell Zellkultureinsatz, 30 mm, hydro.PTFE, 0,4 µm, Merck Millipore) gebracht und in eine 6-Well-Platte in Kultur überführt werden. Das Kulturmedium wurde dreimal in der Woche gewechselt. Die Zellkulturmedien, welche für die Präparation und Kultivierung von OHSCs verwendet wurden, sind mit Herstellerangaben in der Tabelle 7 aufgelistet.

2.2.2.2 Elektrophysiologische Messungen von OHSCs

Um die Aktivitäten der GCs von OHSCs elektrophysiologisch messen zu können, wurde die Membran in einem Abstand von ungefähr zwei Zentimetern um die kultivierten Hirnschnitte am Experimenttag ausgeschnitten und für den Transport in eine Petrischale mit Zellkulturmedium gelegt. Am Patch-Clamp-Set-Up wurde die Membran mit dem Hirnschnitt dann in die mit ACSF (Tabelle 1) gefüllte Badkammer gelegt und mit dem *Grid* fixiert. Für pharmakologische Untersuchungen kam außerdem die CTRL-Lösung zum Einsatz (Tabelle 2). Mit einem Zusatz von Biocytin (ϵ -Biotinoyl-L-Lysine, Invitrogen) in der Pipettenlösung konnten gemessene Zellen nach einer immunohistochemischen Präparation mit der Bindung von Streptavidin Alexa Fluor® 546 conjugate (Molecular Probes) an Biocytin, detektiert werden (Kapitel 2.2.4).

2.2.3 Der Gen-Transfer von DNA in organotypische Schnittkulturen

Da die Plasmamembran von Zellen nur begrenzt DNA spontan aufnehmen kann und die Wahrscheinlichkeit, dass ein DNA-Molekül in einer OHSC zu den GCs diffundiert und dort in eine Zelle geschleust wird zu gering ist, wurde untersucht, mit welcher Methode die schlechte Membrangängigkeit umgangen und die höchste DNA-Aufnahmerate erzielt werden kann.

2.2.3.1 Gen-Transfer via Lipofectamine™2000

Die RNAi-kodierende Sequenz sollte zunächst in dem pcDNA6.2-miRNA Plasmid mittels Lipofectamine (Lipofectamine™2000, Invitrogen™, Karlsruhe) in die Zellen der OHSCs geschleust werden. Lipofectamine ist ein von Invitrogen entwickeltes Reagenz, welches auf der Bildung von kationischen Liposomen in einer wässrigen Umgebung basiert. Die Liposomen können die DNA umschließen und diese durch die Fusionierung mit der Membran in das Zellinnere geschleust (Hayes et al., 2006). Die Expressionsvektoren und das Lipofectamine wurden nach Protokoll des Herstellers dafür zunächst getrennt, jeweils mit Serum-freien Opti-MEM™ (Invitrogen) angesetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen miteinander vermischt und nochmal für 20 Minuten inkubiert. Die verschiedenen OHSCs wurden daraufhin mit unterschiedlichen Mengen an DNA und Lipofectamine (A-D, Tabelle 8) versetzt und für vier bis 12 Stunden im Zellkulturinkubator inkubiert.

Tabelle 8: Die verschiedenen, eingesetzten DNA- und Lipofectamine™ 2000-Konzentrationen. Es wurden vier unterschiedliche Zusammensetzungen getestet. Die DNA- und Lipofectamine™ 2000-Ansätze wurden zunächst getrennt voneinander für 5 Minuten inkubiert. Die Ansätze 1 und 2 wurden dann zusammen gemischt und vor Applikation auf die OHSC nochmal für 20 Minuten inkubiert. SF = Serum-frei.

	A	B	C	D
Ansatz 1	3.5 µg DNA + 150 µl SF Medium	3.5 µg DNA + 150 µl SF Medium	4 µg DNA + 150 µl SF Medium	4 µg DNA + 150 µl SF Medium

Ansatz 2	6 µl Lipofectamine + 150 µl SF Medium	9 µl Lipofectamine + 150 µl SF Medium	6 µl Lipofectamine + 150 µl SF Medium	9 µl Lipofectamine + 150 µl SF Medium
5 Minuten				
Ansatz 3: DNA + Lipofectamine in Opti-MEM™				
20 Minuten				

Ebenso wurden unterschiedliche Methoden für die Applikation des Ansatzes auf die OHSC getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Drei verschiedene Methoden für die Applikation von Ansatz 3 auf die OHSC. Der Ansatz 3 wurde entweder über einen Tropfen auf die OHSC gebracht („Tropfen“), in einem größerem Volumen über die gesamten OHSCs einer Membran appliziert („Benetzung“) oder wurde ins Zellkulturmedium unter die Membran gegeben („Medium“).

	„Tropfen“	„Benetzung“	„Medium“
Methoden	10µl Tropfen von Ansatz 3, Wiederholung bis zu vier Mal	300 µl Ansatz 3 überdeckt OHSC	300 µl Ansatz 3 + 900 µl SF Medium
Inkubationszeiten	Tropfen bleibt auf Schnitt, Mediumwechsel nach 12-24 Stunden	Lösung wird nach einer Stunde abgenommen	Mediumwechsel nach 12-24 Stunden

Erstens wurde der Ansatz 3 (siehe Tabelle 8) in mehreren Wiederholungsschritten mit 30-Minütiger Inkubation in Form eines 10 µl-Tropfens direkt auf die Kultur appliziert („Tropfen“, Tabelle 9). Zweitens wurden 300 µl des Ansatzes 3 auf die Membran pipettiert, so dass die Lösung alle Schnitte auf einer Membran bedeckt („Benetzung“, Tabelle 9). Diese wurde dann nach einer Stunde abgenommen. Und drittens wurde der Ansatz 3 in das Zellkulturmedium gegeben, welches mit der Membran und den OHSC von unten in Berührung kommt („Medium“, Tabelle 9). Die Transfektion wurde zwei bis vier Stunden oder im Falle der „Benetzung“ der OHSCs drei Tage nach der OHSC-Präparation durchgeführt, um den Kulturen eine Regenerationszeit im Brutschrank zu gewähren. Ein späterer Zeitpunkt wurde wegen des schnellen Gliazell-Wachstums und der geringen Reichweite des Lipofectamine-DNA Komplexes vermieden.

2.2.3.2 Adenovirus: Produktion und Injektion in OHSCs

Da der Gentransfer via Lipofectamine keine Erfolge erzielte, kamen Adenoviren zum Einsatz. Die miRNA-kodierende DNA wurde dafür via Gateway Reaktion in den adenoviralen Vektor pAd/CMV/V5-DEST™ (36.7 kb) von Invitrogen kloniert (Kapitel 2.2.1.3). Nach der Sequenzierung wurden die fertigen DNA-Plasmide an die Arbeitsgruppe von Prof. Brigitte M. Pützer vom Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung (IEGT) zur Virusproduktion weitergegeben. Das IEGT stellte

außerdem den Kontrollvirus Ad/CMV-GFP. Die verwendeten Viren sind mit Virustiter in der Tabelle 10 aufgeführt. Die Adenoviren wurden mit drei verschiedenen Methoden auf bzw. in die OHSC gebracht (Ridoux et al., 1995). Erstens wurde der Virus verdünnt und unverdünnt über eine wiederholte Applikation mittels eines 10 µl-Tropfens auf die Kultur gebracht. Zweitens wurden die OHSCs direkt nach der Präparation in einer Viruslösung inkubiert und drittens wurde der Virus über eine lokale Mikroinjektion direkt in den DG injiziert.

Tabelle 10: Die für die Injektion von OHSC eingesetzten Adenoviren mit Angabe des Virus Titers. Den Virus Titer hat das IEGT über ein *Plaque Assay* bestimmt. Die Konzentration an infektiösen Partikeln wird als *plaque forming units* (PFU) je Milliliter angegeben.

Adenovirus	Virus Titer in PFU/ml
Ad/CMV/EmGFP-Kcni11_52	6.2×10^9
pAd/CMV/GFP	3.8×10^9

Für die Tropfen-Applikation wurde der Virus zunächst in verschiedenen Verdünnungen (Minimum 1:20) in Zellkulturmedium punktuell auf eine OHSC gebracht und die Kultur in den Zellkulturschrank gestellt. Alle 30 Minuten wurde die Prozedur wiederholt. Im nächsten Schritt wurde auch der unverdünnte Virus auf die OHSC pipettiert. Für die Inkubation des OHSCs in einer Viruslösung, wurden unterschiedliche Mengen an Virus (1:100 bis 1:200) zu dem Zellkulturmedium in einer Petrischale gegeben. Die frisch heraus präparierte OHSC wurde in die Lösung gelegt und die Schale für eine halbe bis ganze Stunde im Zellkulturschrank inkubiert. Daraufhin wurde die OHSC wie gewohnt auf einer Membran platziert und zurück in den Zellkulturschrank gebracht. Für die lokale Mikroinjektion kam eine Glaskapillare zum Einsatz, die nach dem gleichen Protokoll wie die Patchpipetten (Kapitel 2.1.2) gezogen wurde. Unter einem Mikroskop wurde die Spitze abgebrochen, so dass eine Öffnung von ungefähr 20 µm entstand. An die hintere Öffnung der Glaskapillare wurde ein Schlauch angebracht, an dessen Ende eine 5 ml-Pipette befestigt war. Die Glaspipette wurde an einem Mikromanipulator angebracht, mit dem in kleinen Schritten manuell in alle Richtungen gefahren werden konnte, und unter einem Mikroskop platziert. Der Virus wurde über die Kapillarkraft in die Glaspipettenöffnung eingesaugt und unter Sichtkontrolle an den DG herangefahren. Über eine Mikroperfusionspumpe (CMA/100, Carnegie Medicine, Stockholm) konnten kleine Volumina von weniger als 0.5 µl lokal direkt in das suprapyramidale Band des DG injiziert werden.

2.2.4 Immunohistochemie

Zur Detektion von transfizierten bzw. infizierten GCs, wurden die organotypischen Schnittkulturen immunohistochemisch behandelt. Dafür wurde die Membran um die OHSCs herum mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Fixierung zunächst in 4 %-iges Paraformaldehyd eingelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit 0.1 M Phosphatpuffer (PB) wurden die OHSCs für 30 Minuten in einer PB-Lösung mit 10 % normalem Ziegenerum

(NGS, Dianova, München) und 0.3 % Triton X (TX, Merck Millipore) inkubiert. Daraufhin wurden sie über die Nacht in eine Lösung aus 0.1 M PB, 1 % NGS, 0.3 % TX und einem Primärantikörper gelegt. Der Primärantikörper war entweder ein gegen Prox1 gerichteter oder ein gegen NeuN gerichteter Antikörper (AK, Sigma Aldrich, München). Der Prox1-AK markiert im Hippocampus nur die GCs, während der NeuN-AK ein neuronaler Marker ist. Beide wurden in einem Verhältnis von 1:400 eingesetzt und sind Anti-Kaninchen-AKs. Nach einer Übernachtinkubation bei 4 °C, wurden die Schnitte erneut mehrmals mit 0.1 M PB gewaschen. Daraufhin kam der Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen aus der Ziege) zum Einsatz, der mit Cy5 (Cyanine Dyes) fluoreszenzmarkiert ist. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:400 in einer 0.1 M PB-Lösung mit 0.3 % TX gebracht. Waren mit Biocytin gefüllte Zellen vorhanden, wurde ebenfalls Streptavidin im Verhältnis 1: 400 verwendet. Die Schnitte wurden in der Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag erneut mehrmals gewaschen. Daraufhin wurden sie in ProLong® Gold Antifade Mountant mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Molecular Probes) auf Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt.

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung der transfizierten und transduzierten Schnittkulturen wurden diese mit der externen Lichtquelle Leica EL6000 beleuchtet und unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 visualisiert. Über die Software Leica Application Suite X konnten die Mikroskop-Bilder dargestellt und aufgenommen werden.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte gegliedert. Das erste Kapitel beinhaltet die elektrophysiologische Charakterisierung von Körnerzellen (GCs) im Akutschnitt mit und ohne Kainat (KA)-induzierter Epilepsie. Hier werden der sAHP-Strom, sowie der funktionelle Phänotyp vorgestellt. Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse der umfangreichen, pharmakologischen Untersuchung des sAHP-Stroms aufgeführt. Das letzte Kapitel umfasst die molekular- und zellbiologischen Ergebnisse der Etablierung eines *Knock Down*-Systems für zukünftige Experimente.

3.1 Elektrophysiologische Untersuchung des sAHP-Stroms

Qualität der Patch-Clamp-Messung. Durch die Pipetten-Membranformation nach dem Anpatchen einer Zelle bildet sich ein Abdichtungswiderstand (R_{seal}) aus. Dieser sollte im Verhältnis zum Eingangswiderstand (R_{in}) ausreichend groß sein (R_{in} zu $R_{\text{seal}} < 0.3$) (Tyzio et al., 2003). Im Mittel befand sich der R_{seal} im zweistelligen Gigaohm-Bereich (Tabelle 11), wobei der R_{in} bei $755 \pm 21 \text{ M}\Omega$ lag (Tabelle 12).

Tabelle 11: Widerstände, die zu Beginn eines Patch-Clamp-Experimentes gemessen wurden (n = 166). Aufgelistet ist der Pipettenwiderstand R_{pip} , der ein Maß für die Größe der Pipettenöffnung ist. Der Widerstand, der zwischen der Membran und der Pipette nach dem Anpatchen entsteht, wird auch R_{seal} genannt. Der Serienwiderstand R_{ser} wird im current clamp-Modus nach der Etablierung eines elektrischen Zugangs zur Zelle gemessen.

	Naiv
R_{pip}	$5.2 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$
R_{seal}	$10.9 \pm 0.7 \text{ G}\Omega$
R_{ser}	$15.7 \pm 0.3 \text{ M}\Omega$

3.1.1 Eigenschaften von Körnerzellen

Zur Charakterisierung von GCs, der Erfassung der Vitalität der Zelle und der Qualität des „Patches“ gehört die elektrophysiologische Messung der passiven Eigenschaften. Die Parameter Ruhemembranpotential (V_{Rest}), Serienwiderstand und Membranzeitkonstante (τ_m), sowie die aktiven Eigenschaften wurden routinemäßig im cc-Modus aufgezeichnet. Im vc-Modus wurde der Eingangswiderstand gemessen und der sAHP-Strom untersucht.

Passive Eigenschaften. In der Tabelle 12 sind die Standardparameter einer Routinemessung aufgeführt. Bei den hier durchgeführten *perforated* Patch-Clamp-Messungen liegt der R_{in} ($755 \pm 21 \text{ M}\Omega$, $n = 166$) höher als bei Standard *whole cell*-Messungen ($318 \pm 23 \text{ M}\Omega$, $n = 20$), die ich und andere (Young et al., 2009) ebenso durchgeführt haben. Das liegt, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, an der in der Pipette verbleibenden Membran, welche durch Gramicidinporen nur für Kationen elektrisch durchgängig gemacht wird, aber noch einen erheblichen Widerstand bedeutet. Das

Membranpotential liegt bei rund -84 mV, womit die GCs ein im Vergleich zu anderen Neuronen, wie z.B. den PCs mit einem Ruhemembranpotential von -67 mV (Zweers et al., 2007), hyperpolarisiertes Membranpotential besitzen. Das Membranpotential war im Mittel bei 33.8 ± 2.6 ms auf 63% der maximalen Potentialänderung angestiegen. Eine ähnliche Zeitkonstante wurde bereits von früheren GC-Studien beschrieben (Staley et al., 1992; Young et al., 2009). Die Membranzeitkonstante kann – bei gleicher Kapazität – als Korrelat der spezifischen (oberflächenunabhängigen) Membranleitfähigkeit (R_m) angesehen werden ($\tau_m = R_m \cdot C_m$). Bei den deutlich dichteren, unreifen GCs z.B. findet die Umladung mit einer Membranzeitkonstante von 285 ± 2.6 ms (Young et al., 2009) sehr viel langsamer statt.

Tabelle 12: Der mittlere Widerstand R_{in} , sowie die Membranzeitkonstante τ_m und das Ruhemembranpotential V_{rest} von naiven Körnerzellen (n = 166).

Passive Parameter

R_{in}	$755 \pm 21 \text{ M}\Omega$
V_{rest}	$-83.6 \pm 0.6 \text{ mV}$
τ_m	$33.8 \pm 2.6 \text{ ms}$

Aktive Eigenschaften. Zu den aktiven Eigenschaften gehört das Aktionspotentialmuster (funktioneller Phänotyp) eines Neurons, welches in Folge auf einen konstanten Reiz erkennbar wird. Für die Charakterisierung des Musters wurden schrittweise depolarisierende Ströme von 10 pA injiziert (zwei Sekunden) und die darauf folgende Spannungsänderung beobachtet. Außerdem wurden die Rheobase, der Schwellenwert und die Dauer und Amplitude des jeweils zuerst auftretenden Aktionspotentials gemessen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Die aktiven Parameter von Körnerzellen, gemessen im cc-Modus.

Aktive Parameter

Rheobase	$86.8 \pm 3.9 \text{ pA}$ (n = 99)
Schwellenwert	$-34.6 \pm 0.9 \text{ mV}$ (n = 99)
AP-Dauer	$1.2 \pm 0.1 \text{ ms}$ (n = 105)
AP-Amplitude	$60.3 \pm 1.6 \text{ mV}$ (n = 123)

Körnerzellen sind „Alles-oder-Nichts“-*burster*. Obwohl das Aktionspotentialmuster von GCs schon oft charakterisiert wurde (Andersen et al., 2007; Gupta et al., 2012; Nenov et al., 2015; Podlogar & Dietrich, 2006; Scharfman, 1992), stellte sich im Rahmen dieser Arbeit heraus, dass dieses mit der *perforated* Patch-Clamp-Methode anders aussah als zuvor beschrieben. Durchgehende Aktionspotentialaktivität, sowie adaptierende Aktivität – die oft den GCs zugeschriebenen Antwortverhalten – wurde viel seltener als angenommen beobachtet. Aus diesem Grund wurde die Aktionspotentialantwort mit der *perforated* Patch-Clamp-Methode noch einmal systematisch quantifiziert. Die ersten APs tauchten bei einem Schwellenwert von -35 mV auf (Tabelle 13). Ab diesem

Schwellenpotential zeigten 91.5% ($n = 141$) der gemessenen GCs ein *burst*-Verhalten nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip (wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben und Abb. 14 A gezeigt). In 6.4% der Zellen zeigte sich ein adaptierender AP-Entladungstypen (SFA, Abb. 14 B) und nur 2.1% der Zellen adaptierten sehr schwach (Abb. 14 C). Dieses AP-Antwortverhalten weicht stark von bisherigen Beschreibungen ab.

3.1.2 Die elektrophysiologische Messung des sAHP-Stroms

Nach der Aufzeichnung der Standardparameter der Körnerzelle wurden die Zellen im vc-Modus schrittweise zunächst auf -70 mV und dann auf -55 mV geklemmt, um anschließend den sAHP-Strom durch einen depolarisierenden Puls von 10 mV auszulösen (wie beschrieben in Kapitel 2.1.6, Spannungsspur in Abb. 11 A).

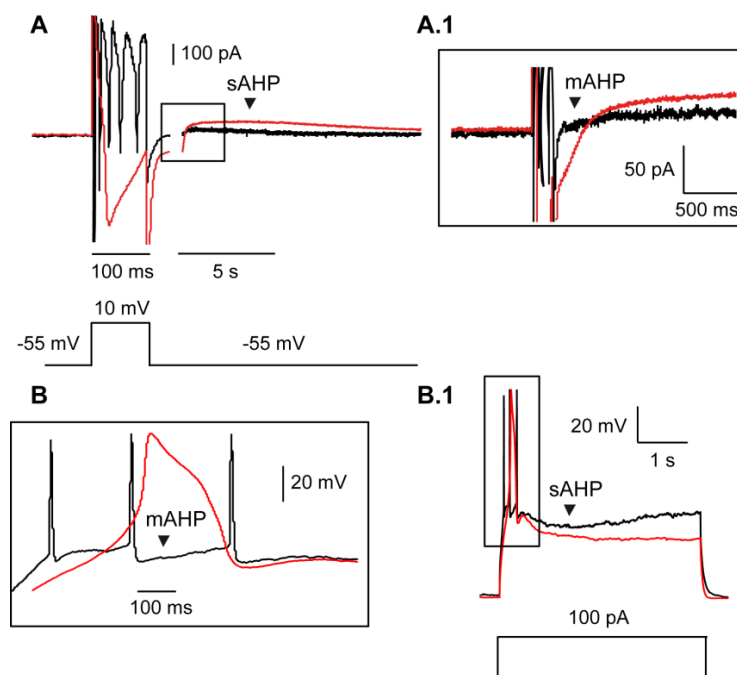


Abb. 11: Analyse des sAHP-Stroms, im Vergleich ACSF vs. CTRL und vc-Messung vs. cc-Messung. Die schwarzen Strom- bzw. Spannungsspur zeigen den sAHP-Strom (I_{sAHP}) in ACSF-Lösung, die roten die Strom- bzw. Spannungsspur in CTRL-Lösung. (A) Der sAHP-Strom, gemessen im vc-Modus, mit vergrößertem, sAHP-auslösendem Puls. Die depolarisierende Spannungsänderung auf 10 mV löste einwärtsgerichtete Ionenströme in die Zelle aus, die sich in Form von Aktionsströmen zeigten. Letztere verschmolzen in der CTRL-Lösung (mit der Blockade von Natriumkanälen) zu einem einzelnen, großen Einstrom. Mit der pharmakologischen Isolierung des sAHP-Stroms in der CTRL-Lösung, gewann dieser auch an Größe (Abb. 12 A,B). Das Spannungsprotokoll ist schematisch unter der Stromspur dargestellt. (A.1) Der Ausschnitt aus A zeigt die initiale Phase des mAHP (ImAHP)- und sAHP-Stroms. Die pharmakologische Inhibition des mAHP-Stroms in der CTRL-Lösung ließ die langsame Anstiegsphase des sAHP-Stroms erkennen. (B) Der Ausschnitt aus B.1, einer Messung, aufgenommen im cc-Modus, zeigt ebenfalls die Aktionspotentiale im ACSF, die in der CTRL-Lösung durch einen großen, einzelnen Einstrom ersetzt werden. (B.1) Ein 2s langer Strompuls von 100 pA löste in ACSF-Lösung einen *burst* von Aktionspotentialen aus, welcher von einem prominenten sAHP gefolgt wurde. Hier konnte ebenfalls die Vergrößerung der sAHP-Amplitude in der CTRL-Lösung beobachtet werden.

Die ersten zwei bis drei Minuten wurde das sAHP-Strom-Protokoll in ACSF durchgeführt. Um den sAHP-Strom dann isoliert zu messen, wurde das Gewebe mit einer

Kontrolllösung (CTRL) umspült, die Blocker der am AP, mAHP und fAHP beteiligten Ionenkanäle, sowie der synaptischen Rezeptoren enthielt (Tabelle 2). Die CTRL-Lösung führte in den meisten Fällen zu einer Zunahme der sAHP-Stromamplitude (Abb. 12 A, B). Im Mittel nahm der sAHP-Strom um $37 \pm 11\%$ zu ($n = 99$, $p < 0.0001$).

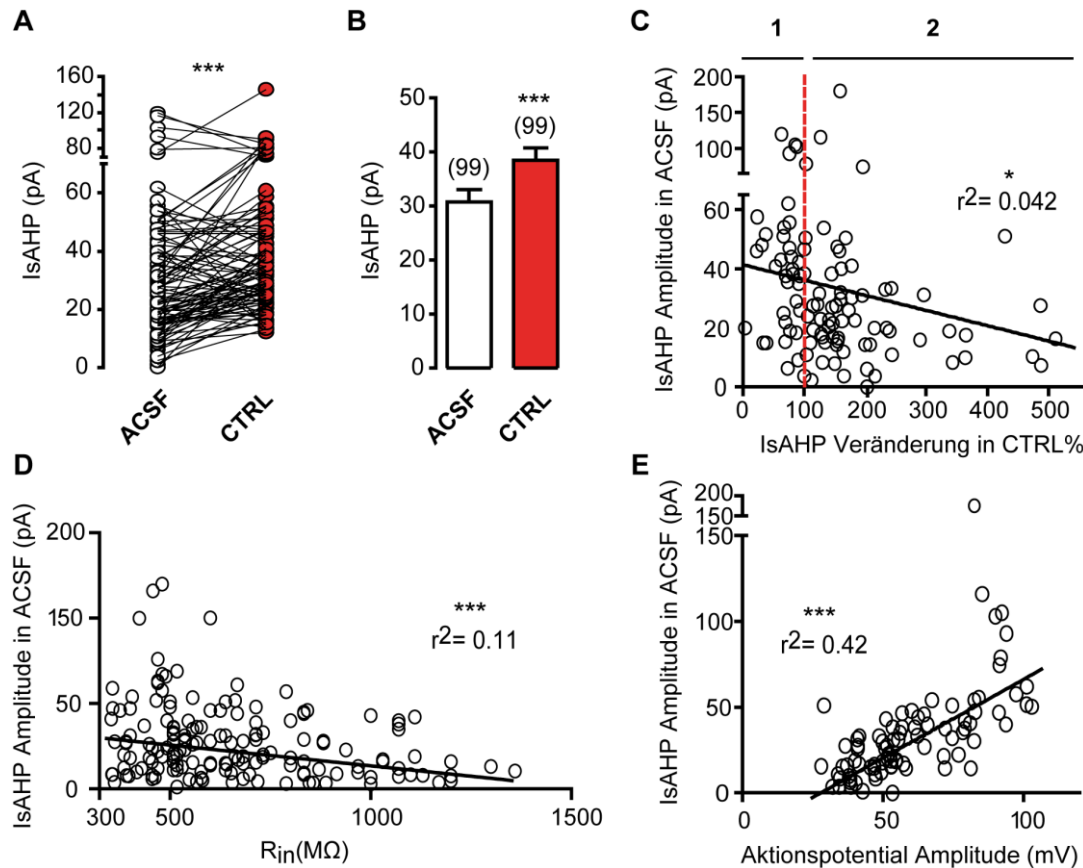


Abb. 12: Der Vergleich von maximalen sAHP-Stromamplituden vor und nach Applikation der CTRL-Lösung. (A) Die Einzelwerte der sAHP-Strom (IsAHP)-Amplituden zeigten eine breite Streuung der Stromausprägung in unterschiedlichen Körnerzellen. Es kann trotzdem unschwer erkannt werden, dass in der CTRL-Lösung die sAHP-Stromamplitude meistens zunimmt. (B) Das Balkendiagramm zeigt die gemittelten sAHP-Stromamplitudenwerte. Der sAHP-Strom trat in der CTRL-Lösung signifikant erhöht auf. (C) Der Graph zeigt die Korrelation zwischen sAHP-Stromanfangsamplitude in der ACSF-Lösung und der Ausprägung der Amplitudenveränderung in der CTRL-Lösung. 1 steht für eine Amplitudenabnahme (< 100%) und 2 für eine Amplitudenzunahme (> 100%). Je größer der sAHP-Strom von vornherein in der ACSF-Lösung war, desto geringer die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Zunahme in der CTRL-Lösung ($n = 105$, $p = 0.04$). (D) Die Beziehung zwischen sAHP-Stromamplitudengröße und Eingangswiderstand (R_{in}). Je größer der R_{in} war, desto kleiner waren die sAHP-Stromamplituden ausgeprägt ($n = 177$, $p < 0.0001$). (E) Korrelation zwischen sAHP-Stromamplitudengröße in ACSF-Lösung und der AP-Amplitudengröße. Je größer die AP-Amplitude war, desto größer war auch die maximale sAHP-Stromamplitude in ACSF ($n = 86$, $p < 0.0001$).

Es wurde ein breites Spektrum an sAHP-Ausgangsamplitudengrößen in der ACSF- und CTRL-Lösung beobachtet (Abb. 12 A). Ein Grund hierfür könnten unterschiedliche Zugangswiderstände der Messungen sein, die sich evtl. auch in den Eingangswiderständen niederschlagen und für einen Unterschied in der Wirksamkeit des Auslösepulses gesorgt haben könnten (Abb. 12 D, $p < 0.0001$, $n = 177$). Dafür sprechen auch die unterschiedlich großen AP-Amplituden, welche mit den sAHP-Stromamplituden

im ACSF korrelieren (Abb. 12 E, $n = 86$, $r^2 = 0.42$, $p < 0.0001$). Andererseits kann auch die Heterogenität oder der Zustand der Zelle einem guten Teil der Unterschiede zugrunde liegen. Ein Zusammenhang mit anderen Messparametern wie R_{ser} , Temperatur oder der Zeit nach der Präparation, etc. konnte jedenfalls nicht festgestellt werden. Die mittlere Ausgangsamplitude im ACSF lag bei 31 ± 2 pA ($n = 99$). In der CTRL-Lösung lag die mittlere sAHP-Stromamplitude bei 39 ± 2 pA ($n = 99$, Abb. 12 B). Je kleiner die sAHP-Strom-Ausgangsamplitude im ACSF war, desto größer war die Amplitudenzunahme in der CTRL-Lösung, während sAHP-Ströme mit großen Amplituden in der CTRL-Lösung häufiger wieder abnahmen ($n = 105$, $r^2 = 0.042$, $p = 0.04$, Abb. 12 C). Die Zunahme ist höchstwahrscheinlich auf einen erhöhten Calciumstrom, welcher an einem breiterem AP erkennbar ist (siehe Abb. 11 B) u.a. als Folge der Blockade von BK-Kanälen und damit des fAHPs, zurück zuführen (Lancaster & Nicoll, 1987).

Zusätzlich zu der Größenänderung der sAHP-Stromamplitude in der CTRL-Lösung können weitere Veränderungen der Stromspur festgestellt werden. Dazu gehört eine veränderte Kinetik. In der CTRL-Lösung ist der sAHP-Strom verlängert. Diese Beobachtung kann ebenso mit dem erhöhten Calciumstrom erklärt werden (s.o.). Die pharmakologische Isolierung des sAHP-Stroms, lässt auch die prominente Anstiegsphase erkennen, welche wie zuvor beschrieben etwa zehnmal langsamer ist als die des mAHP-Stroms (Lancaster & Adams, 1986; Sah & McLachlan, 1991). Die Blockade der Natriumkanäle in der CTRL-Lösung ist in der Stromspur während des Spannungspulses zu erkennen. Diese war zuvor in ACSF-Lösung von ungeklemmten Aktionspotentialen in variabler Anzahl durchsetzt und wird nun in der CTRL-Lösung durch einen einzelnen, breiten Einstrom ersetzt (Abb. 11 A).

Die Messung des sAHP-Stroms muss unter stabilen Bedingungen stattfinden. Für die langwierigen pharmakologischen Experimente, war eine stabile Messung des sAHP-Stroms unabdingbar, weil der sAHP-Strom im *whole cell*-Modus einem *rundown* unterliegt, der u.a. von der Pipettenlösung abhängt (Zhang et al., 1994). Um möglichst stabile Messungen zu erreichen, wurde der sAHP-*rundown* im Rahmen dieser Arbeit systematisch unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Vor allem mit Verwendung der Kaliumglukonat-Lösung (siehe Tabelle 1) verschwand die sAHP-Stromamplitude innerhalb kurzer Zeit nach Erreichen der *whole cell*-Konfiguration (Abb. 13 A). In der KMeSO₄-Lösung (siehe Tabelle 1) kam es ebenso zu einer Abnahme der sAHP-Stromamplitude, jedoch dauerte diese länger an und ein Teil des sAHP-Stroms blieb noch länger erhalten (Abb. 13 B). Diese Messungen zeigen, dass ein stabiler sAHP-Strom in GCs von einem intakten intrazellulären Milieu abhängig ist und dieses in der *whole cell*-Konfiguration durch den Austausch mit der Pipettenlösung nicht erhalten bleibt. Folglich wurde für diese Arbeit die *perforated Patch-Clamp*-Methode gewählt.

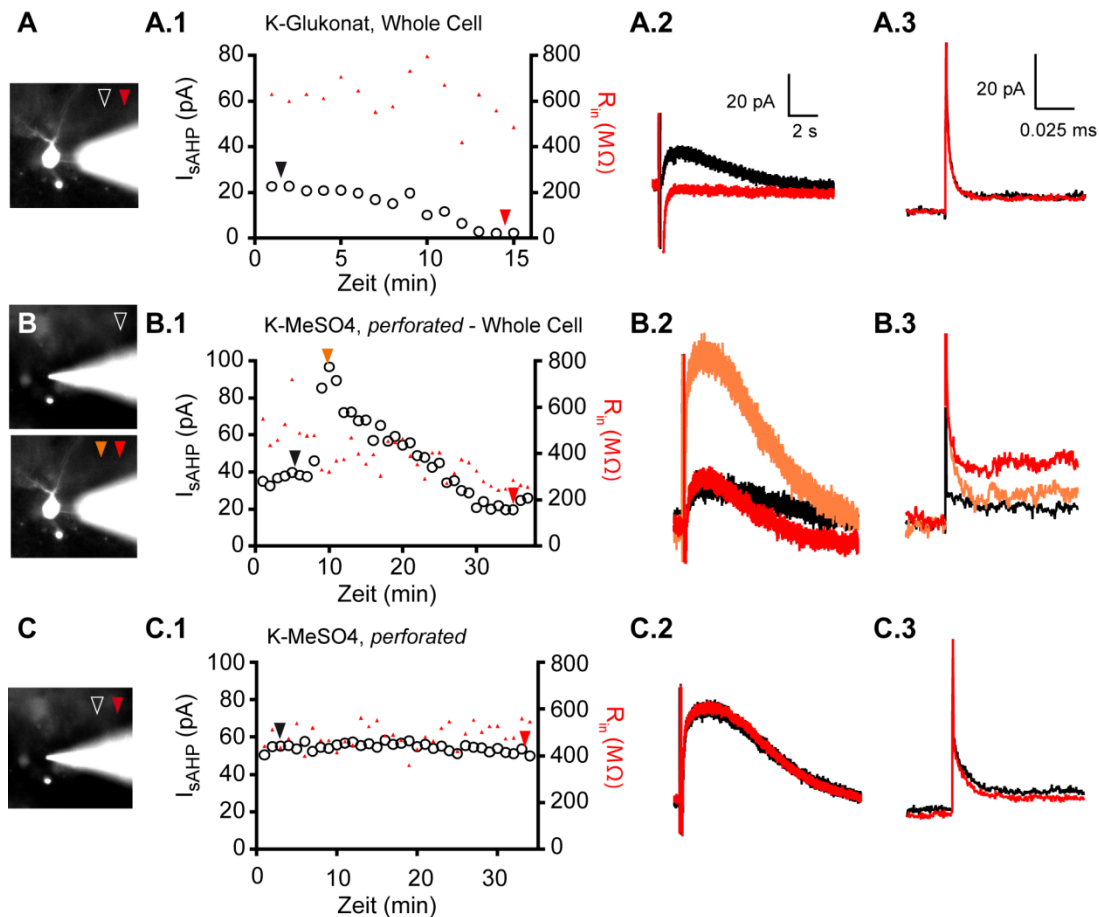


Abb. 13: Aufzeichnungen des sAHP-Stroms und des Eingangswiderstandes im vc-Modus und unter Einsatz verschiedener Patchpipettenlösungen. (A) Die Mikroskopaufnahme zeigt eine mit Alexa gefüllte Körnerzelle im *whole cell*-Modus. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Aufnahme während der Messung in A.1. (A.1) Eine Beispiel-Messung mit dem Einsatz der Kaliumglukonat-Lösung. Hier zeigte sich von vornherein ein kleiner sAHP-Strom (I_{sAHP} , Kreise), der immer weiter abnahm. (A.2) Die sAHP-Stromspuren am Anfang der Messung (schwarz) und am Ende der Messung (rot). Nach 15 Minuten war kein sAHP-Strom mehr zu verzeichnen. (A.3) Der Testpuls am Anfang jedes sAHP-Stromprotokolls löste einen kleinen Ionenausstrom aus. Am initialen Punkt des Pulses entstand ein verstärkter, transientser Ionenstrom, der sich auf eine *baseline* (*steady state*) einpendelte. Aus der gegebenen Spannung und dem Ionenfluss am *steady state* ließ sich der Eingangswiderstand errechnen. Unter der Kaliumglukonat-Lösung kam es zu keiner Änderung des Eingangswiderstandes. (B) Die obere Aufnahme zeigt Alexa in einer Patchpipette, zu einem Zeitpunkt einer Messung im *perforated*-Modus, die untere zeigt eine gefüllte Zelle im *whole cell*-Modus. (B.1) Gezeigt ist eine Messung, die im *perforated* Patch-Clamp-Modus beginnt (schwarz). Nach einem Durchbruch der Membran kam es zunächst zu einer starken Zunahme des sAHP-Stroms (orange) mit anschließender Abnahme (rot). Der Eingangswiderstand (rote Dreiecke) reduzierte sich um mehr als 200 M Ω . (B.2) Der sAHP-Strom nahm zunächst stark zu, um dann wieder abzunehmen. Die Kinetik der Stromspur veränderte sich. (B.3) An der Stromantwort infolge des Testpulses ist deutlich eine Änderung des Eingangswiderstandes zu erkennen. (C) Die Aufnahme entstand während einer Messung im *perforated*-Modus, wie in C.1 gezeigt. (C.1) Unter *perforated* Patch-Clamp-Bedingungen blieb der sAHP-Strom, sowie der Eingangswiderstand stabil. (C.2) Die sAHP-Stromamplitude unter Kontrollbedingungen änderte sich kaum im Laufe eines Experimentes. (C.3) Der Eingangswiderstand blieb weitgehend konstant im Laufe einer Messung.

Der schnelle *rundown* ist erstaunlich angesichts der Tatsache, dass wichtige pharmakologische Arbeiten zur Identität des sAHPs von GCs und PCs nicht im *perforated*-Modus, sondern meistens im *whole-cell*-Modus durchgeführt wurden (Kim et al., 2012; Turner et al., 2016; Tzingounis & Nicoll, 2008; Wang et al., 2016).

Während einer stabilen *perforated* Patch-Clamp-Messung unter Kontrollbedingungen waren geringe Schwankungen mit einem im Mittel konstanten Eingangswiderstand normal (Abb. 13 C). Kam es jedoch zu einem konstanten Abfall von über 200 M Ω und einer gleichzeitigen Abnahme des sAHP-Stroms, war dies ein Indiz für den Übergang in die *whole cell*-Konfiguration (Abb. 13 B). Ebenso waren plötzliche, große Ausschläge der sAHP-Stromamplitude, die spontan ohne eine Veränderung der äußeren Bedingungen stattfanden, ein Hinweis für eine Änderung des Membranzustandes in der Pipettenöffnung. Mit dieser Methode konnten im Rahmen dieser Arbeit stabile sAHP-Strom-Messungen über einen Zeitraum von 60 Minuten und darüber hinaus durchgeführt werden.

3.1.3 Der funktionelle Phänotyp ist abhängig vom sAHP-Strom

Bei einem Vergleich der sAHP-Stromausprägung im vc- und dem zuvor im cc-Modus aufgenommenen „Alles-oder-Nichts“-*burst*-Verhalten, konnte ein Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften herausgestellt werden (Abb. 14).

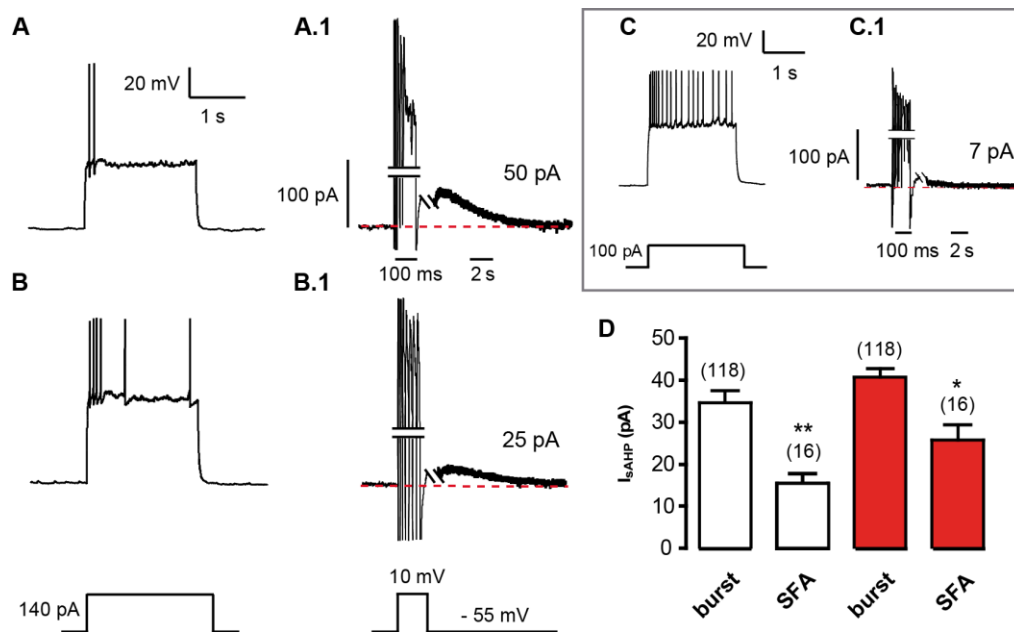


Abb. 14: Die Beziehung zwischen dem funktionellen Phänotypen, aufgenommen im cc-Modus und dem sAHP-Strom, gemessen im vc-Modus. (A-D) Spannungsantworten von vier verschiedenen Zellen auf einen Strompuls von 140 pA. (A) „Alles-oder-Nichts“-*burst*-Phänotyp, aufgezeichnet im cc-Modus. (A.1) Im vc-Experiment zeigte sich ein prominenter sAHP-Strom (I_{sAHP}) mit einer Amplitude von 50 pA. (B) Ein AP-Muster einer Körnerzelle mit *Spike Frequency Adaptation* (SFA). (B.1) Der sAHP-Strom, aufgezeichnet im vc-Modus, ist im Vergleich zum *burst*-Phänotypen sehr viel kleiner. (C) Ein Beispiel für eine sehr schwach ausgeprägte SFA. Dieser Phänotyp kommt selten in Körnerzellen vor. (C.1) Die Zelle zeigt einen sehr kleinen sAHP-Strom. (D) Die gemittelten sAHP-Stromamplitudengrößen, im Vergleich *burst* vs. SFA, in ACSF- (weiß) und der CTRL-Lösung (rot). Es zeigt sich ein deutlich kleinerer sAHP-Strom in Körnerzellen mit SFA-Verhalten. In der CTRL-Lösung ist der Unterschied nicht mehr ganz so groß, aber auch noch deutlich zu sehen.

Bei den wenigen adaptierenden Phänotypen wurde ein kleinerer sAHP-Strom (15 ± 2 pA, $n = 12$, $p = 0.003$, Abb. 14 B, C) in der ACSF-Lösung gefunden als bei den GCs mit

burst-Phänotyp (35 ± 3 pA, $n = 97$, Abb. 14 A, E). In der CTRL-Lösung konnte das AP-Muster aufgrund der Blockierung von Ionenkanälen zwar nicht mehr erkannt werden, jedoch war hier der sAHP-Strom von GCs, welche zuvor in ACSF-Lösung eine SFA-Charakteristik zeigten, immer noch signifikant kleiner, auch wenn die Differenz nicht mehr ganz so groß war (*burst*: 49 ± 3 pA, $n = 97$, SFA: 26 ± 4 pA, $n = 15$, $p = 0.021$). Es konnten insgesamt nur drei Zellen beobachtet werden, die eine sehr geringe SFA aufwiesen und ein kaum nachweisbaren sAHP-Strom zeigten (Abb. 14 C). Außerdem wurde beobachtet, dass Zellen mit SFA eine signifikant kleinere AP-Amplitude hatten (*burst*: 62 ± 2 mV, $n = 111$, SFA: 43 ± 2 mV, $n = 16$, $p < 0.0001$).

3.1.4 Der sAHP-Strom von Kainat-Körnerzellen

Im Rahmen der sAHP-Strom-Untersuchung im Kainat (KA)-Modell der TLE wurden auch hier die passiven Eigenschaften aufgezeichnet und sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Die passiven und aktiven Eigenschaften von KA-Körnerzellen. Der p-Wert zeigt die statistische Signifikanz und wurde bei der Analyse der Eigenschaften von GCs im Vergleich von Kontroll- zu KA-GCs errechnet.

Passive Parameter		p
R_{in}	604 ± 55 M Ω ($n = 22$)	0.02
V_{rest}	-82.7 ± 1.9 mV ($n = 22$)	0.89
τ_m	23.9 ± 1.9 ms ($n = 20$)	0.04
Aktive Parameter		
Rheobase	138 ± 20 pA ($n = 21$)	0.005
Schwellenwert	-24.5 ± 2.5 mV ($n = 21$)	0.0001
AP-Dauer	1.5 ± 0.1 ms ($n = 20$)	0.14
AP-Amplitude	55.6 ± 3.2 mV ($n = 20$)	0.21

Bei den passiven Eigenschaften fällt auf, dass der Eingangswiderstand in der Kainatgruppe niedriger ist als in der Kontrolle (Tabelle 12). Ebenso liegt die Membranzeitkonstante, welche ein Maß für die spezifische Leitfähigkeit ist, bei KA-GCs signifikant erniedrigt vor. Das Membranpotential hingegen zeigte in KA-GCs keine Abweichungen. Wie nach dem R_{in} -Unterschied zu erwarten ist, ist die Rheobase im Kainat-Modell signifikant erhöht (siehe im Vergleich Tabelle 13). Der Schwellenwert liegt hingegen im Kainat-Modell signifikant reduziert vor. Die Aktionspotentialdauer und -amplitude unterscheiden sich nicht stark voneinander. Alle diese Eigenschaften stimmen mit den zuvor beschriebenen Parametern von KA-GCs überein (Young et al., 2009).

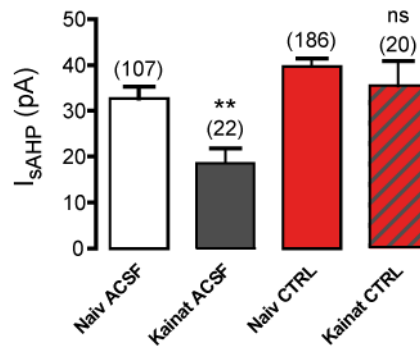


Abb. 15: Der sAHP-Strom von KA-Körnerzellen in ACSF- und CTRL-Lösung. In der ACSF-Lösung wurde im KA-Modell (grauer Balken) ein im Vergleich zur Kontrolle (weißer Balken) signifikant reduzierter sAHP-Strom vorgefunden. In der CTRL-Lösung war die geringe Abnahme des sAHP-Stroms im KA-Modell (grau-rot gestreifter Balken) im Vergleich zur Kontrolle (roter Balken) jedoch nicht signifikant.

Um die Signalweiterleitung der Körnerzelle in der Epilepsieerkrankung zu verstehen, sollte der sAHP-Strom auf mögliche Veränderungen hin, untersucht werden. Während sich in der KA-Körnerzelle in der ACSF-Lösung im Mittel ein reduzierter sAHP-Strom zeigte (Abb. 15, Abnahme um 43 ± 10 %), wich die sAHP-Stromgröße in der CTRL-Lösung kaum mehr von der Kontrollgruppe ab (12 ± 15 %, $p = 0.23$ ns).

3.2 Die Pharmakologie des sAHP-Stroms von Körnerzellen

In vergangenen Studien gab es viele Unklarheiten und Dispute über das sAHP von verschiedenen Zelltypen, inklusive der GCs (Tanner et al., 2011; Tzingounis & Nicoll, 2008; van de Vrede et al., 2007). R. Andrade betitelte so ein Review über das sAHP mit „*cutting through the Gordian knot*“ (deut. durch den gordischen Knoten schneiden) und weist damit auf die komplexe Problemstellung hin (Andrade et al., 2012). Häufig wurden bei den Diskussionen um das sAHP unterschiedliche Messmethoden verglichen, wobei das sAHP, wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, im *whole cell*-Modus anfällig für einen *rundown* ist. Aus diesem Grund wurde die pharmakologische Charakterisierung des sAHP-Stroms mithilfe der *perforated* Patch-Clamp-Methode durchgeführt. Für einen Überblick über die Mittelwerte der Pharmakologie siehe Abb. 37 auf Seite 91.

3.2.1 Der sAHP-Strom ist ein Kaliumstrom

Der sAHP-Strom wurde in vielen Studien als ein Kaliumstrom identifiziert (Alger & Nicoll, 1980; Andrade & Aghajanian, 1984; Hotson & Prince, 1980; Lancaster & Adams, 1986). Über die Applikation einer Spannungsrampe und die Beobachtung des resultierenden Ionenstroms konnte hier eine Abhängigkeit des Umkehrpotentials von der Kaliumkonzentration festgestellt werden (Abb. 16). Mit einer extrazellulären Konzentration von 2 mM Kalium erfolgte ein Ionenausstrom bis zur Etablierung eines Haltepotentials von -90.6 mV ($n = 5$), daraufhin wechselte der Strom die Richtung und strömte in die Zelle ein. Das Umkehrpotential lag dabei in der Nähe des über die Nernstgleichung (Kapitel 1.2) errechneten Kaliumgleichgewichtspotentials von -104.3 mV. Die Abweichung zwischen Theorie und Praxis spricht entweder dafür, dass dem

sAHP-Strom ein sehr kleiner Anteil eines depolarisierenden Stroms beigemischt ist, oder dass z.B. durch die Abschätzung des *liquid junction potentials* (siehe Kapitel 2.1.6.3) ein kleiner Fehler bei der Bestimmung der absoluten Spannung aufgetreten ist. Mit einer extrazellulären Konzentration von 5 mM Kalium, wird das Gleichgewichtspotential mit einer Spannung von -79 mV um 11 mV positiver, wobei das errechnete Kaliumgleichgewichtspotential hier bei -86.8 mV liegt (Abb. 16). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der sAHP-Strom von Kaliumionen getragen wird.

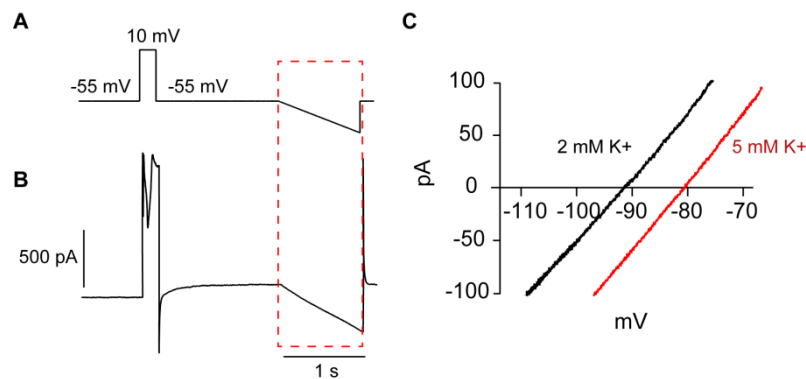


Abb. 16: Die Strom-Spannungskurve zeigt, dass der sAHP-Strom ein Kaliumstrom ist. (A) Das Standard-sAHP-Protokoll wurde durch eine Spannungsrampe von -55 bis -120 mV 1.5 Sekunden nach dem sAHP-Strom-auslösenden Puls ergänzt. (B) Die Stromkinetik zeigt den Calciumeinstrom während des 10 mV-Pulses und einen anschließenden Ionenaustrom, welcher sich auf das abnehmende Haltepotential hin verändert. (C) Der Graph zeigt die Änderung des Haltepotentials, aufgetragen gegen den entsprechenden Ionenstrom, von zwei verschiedenen Experimenten mit unterschiedlicher Kaliumkonzentration in der Extrazellulärlösung. Mit einer extrazellulären Konzentration von 2 mM Kalium kam es zu einem Ionenausstrom bis zu einem Haltepotential von -92 mV, daraufhin wechselte der Strom die Richtung und strömte in die Zelle ein. Mit einer extrazellulären Konzentration von 5 mM Kalium, wurde das Gleichgewichtspotential um 11 mV positiver und zeigt damit die Kalium-Abhängigkeit des Stroms an.

3.2.2 Calcium-Abhängigkeit

Im folgenden Kapitel werden die pharmakologischen Untersuchungen zur Calcium-Abhängigkeit des sAHP-Stroms vorgestellt.

3.2.2.1 Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle

Der sAHP-Strom wurde in bisherigen Studien außerdem als ein Calcium-abhängiger Kaliumstrom beschrieben (siehe Referenzen in Kapitel 3.2.1). Tatsächlich führte der Einsatz des Breitband-Calciumkanalblockers Nickel in Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit, zu einem vollständigen Block des sAHP-Stroms (Abb. 17). Für das Experiment kamen 2 mM Nickel zum Einsatz (siehe Tabelle 3). Die maximale Amplitude sank bei Nickelapplikation im Mittel von 29 ± 8 pA auf 0.2 ± 0.04 pA, das ergibt eine Abnahme der Ausgangsamplitude um $99.3 \pm 0.2\%$ ($n = 5$, $p < 0.05$). Das Ergebnis konnte in späteren Experimenten, bei denen Nickel nach einer Applikation von XE991 und Tolbutamide eingesetzt wurde, bestätigt werden (Kapitel 3.2.12). Die maximale sAHP-Stromamplitude, die in den meisten Fällen bereits durch den Einsatz von XE991 und Tolbutamide abgesunken war, nahm nach der Einstellung einer *baseline* mit Nickelapplikation, nochmals um $78 \pm 0.1\%$ ab (von 17 ± 3 pA auf 0.8 ± 0.4 pA, $n = 15$,

$p < 0.0001$), wobei sich die Abnahme nicht signifikant von derjenigen während des ersten Experimentes unterschied (Abb. 17 C). Der sAHP-Kaliumstrom ist also fast vollständig vom Calciumeinstrom während der sAHP-auslösenden Depolarisierung abhängig.

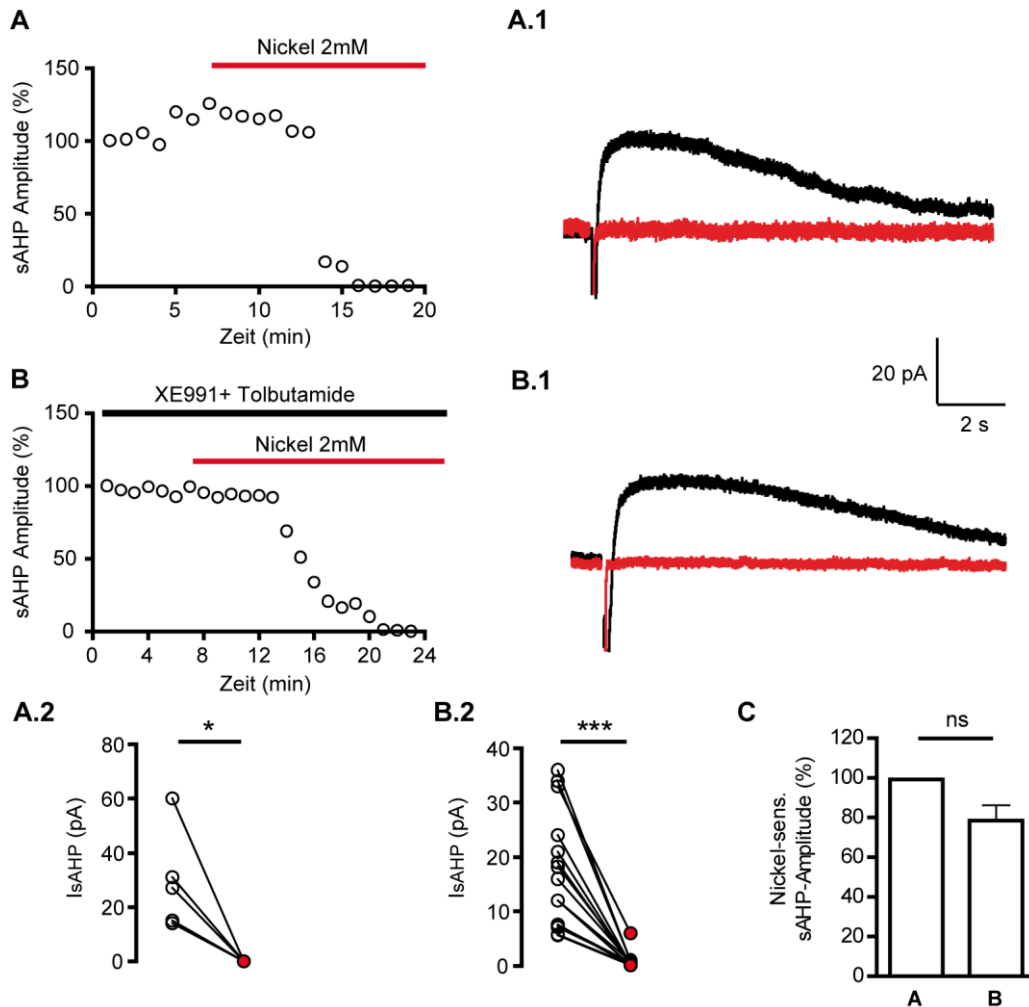


Abb. 17: Der sAHP-Strom wird vollständig durch den Calciumkanalblocker Nickel blockiert. (A) Der Graph zeigt einen Zeitverlauf einer Beispiel-Messung mit Nickelapplikation. Die maximale sAHP-Stromamplitude ist gegen die Zeit aufgetragen. Der rote Balken zeigt die Zeitdauer der Nickelapplikation an. Es zeigte sich eine starke Abnahme der sAHP-Stromamplitude während des Nickeleinsatzes. (A.1) Die schwarze Stromspur einer gemessenen Zelle zeigt den gemittelten sAHP-Strom, welcher als Antwort auf eine starke Spannungsänderung in der CTRL-Lösung auftrat, während die rote Stromspur nach Applikation von Nickel aufgezeichnet wurde. Die Abnahme des sAHP-Stroms ist wieder deutlich zu erkennen (A.2) Der Graph zeigt die Datenpunkte verschiedener Experimente, wobei die in der CTRL-Lösung (links, weiße Punkte) gemessenen max. sAHP-Stromamplituden, denjenigen in der Nickel-Lösung (rechts, rote Punkte) gegenüber gestellt sind. Alle gemessenen sAHP-Stromamplituden wurden vollständig durch Nickel blockiert. (B) Die gezeigte Messung ist im Rahmen einer anderen Messreihe entstanden, diesmal war zusätzlich XE991 und Tolbutamide mit in der CTRL-Lösung. Hier erfolgte ebenso eine Abnahme des sAHP-Stroms bei Nickeleinsatz. (B.1) Die Stromspuren zeigen eine vollständige Abnahme des sAHP-Stroms unter Nickeleinfluss. (B.2) Die Einzelwerte der Experimente mit XE991 und Tolbutamide in der CTRL-Lösung zeigen diese Abnahme bei jeder Messung mit Nickel. (C) In dem Balkendiagramm sind die gemittelten Nickel-sensitiven sAHP-Stromamplituden der Messreihe (A) und (B) aufgeführt.

3.2.2.2 *CalciumEinstrom durch high-voltage-gated (HVA)-Calciumkanäle*

In einigen Studien konnte bereits eine vollständige Blockade des sAHPs durch den HVA-Calciumkanalblocker Cadmium beobachtet werden (Lirk et al., 2008; Shah & Haylett, 2000a; Tzingounis et al., 2007). Um die Beteiligung von HVA-Calciumkanälen am sAHP-Strom von GCs zu untersuchen, wurden 100 μM Cadmium eingesetzt (Abb. 18). Die sAHP-Stromamplitude sank im Mittel von 29 ± 2 pA auf 5 ± 0.4 pA. Somit nahm der sAHP-Strom bei Blockade der HVA-Calciumkanäle um 82 ± 1.3 % ($n = 8$, $p < 0.01$) ab. Die Blockade von Calciumkanälen konnte auch an dem durch den 10 mV-Spannungspuls ausgelöstem Strom erkannt werden, welcher nach Einsatz von Cadmium stark abflachte (Abb. 18 B).

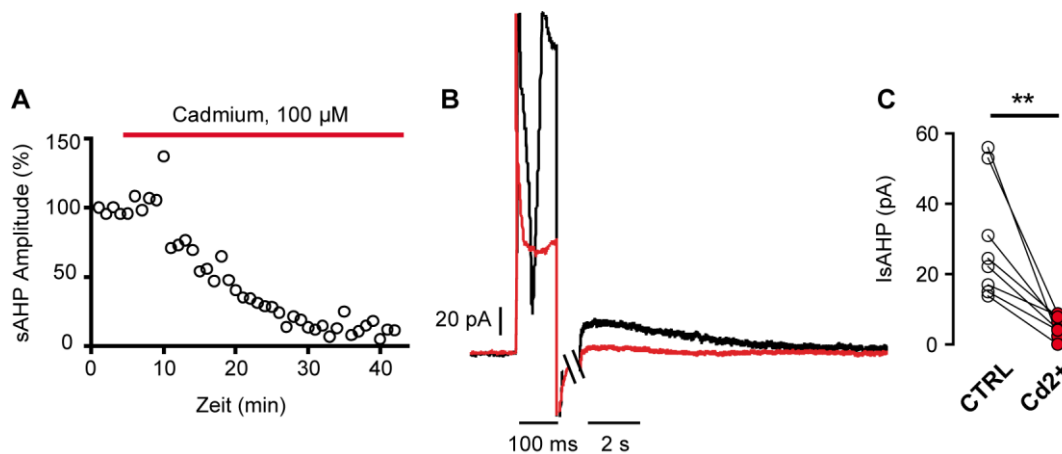


Abb. 18: Der sAHP-Strom unter Einfluss des HVA-Calciumkanalblockers Cadmium. (A) Die Beispiel-Messung zeigt, dass die maximale Amplitude des sAHP-Stroms während des Cadmiumeinsatzes abnahm. (B) Die Stromspuren zeigen den sAHP-Strom zum Anfang der Messung (schwarz) und nach Einsatz von Cadmium (rot). Der Calciumeinstrom ausgelöst durch den 10 mV-Puls ist verbreitert dargestellt und lässt eine Abflachung nach Cadmiumeinsatz erkennen. Die sAHP-Stromamplitude war im Gegensatz zur Kontrolle stark reduziert. (C) Die einzelnen Messungen zeigten eine konsistente und signifikante Abnahme der sAHP-Stromamplitude bei Applikation von Cadmium.

3.2.2.3 *CalciumEinstrom durch L-Typ Calciumkanäle*

Calciumströme durch L-Typ-Calciumkanäle werden durch die Blocker Nifedipine und Nimodipine inhibiert (siehe Tabelle 3). In CA3-PCs und olfaktorischen, kortikalen Neuronen wurde mit dem Einsatz von Nifedipine eine Beteiligung von L-Typ-Calciumkanälen am sAHP-Strom herausgearbeitet (Russo & Constanti, 2004; Tanabe et al., 1998). Mit der Applikation von 15 μM Nifedipine (Abb. 19) und 10 μM Nimodipine (nicht gezeigt) konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Beteiligung der L-Typ-Calciumströme am sAHP-Strom von DG-GCs festgelegt werden. Im Mittel wurde unter Nifedipine-Einfluss kein signifikanter Effekt auf den sAHP-Strom ermittelt (22 ± 24 %, $n = 8$, $p = 0.3$). 10 μM Nimodipine bewirkte ebenso keine signifikante Veränderung des sAHP-Stroms (23 ± 8 %, $n = 5$, $p = 0.4$).

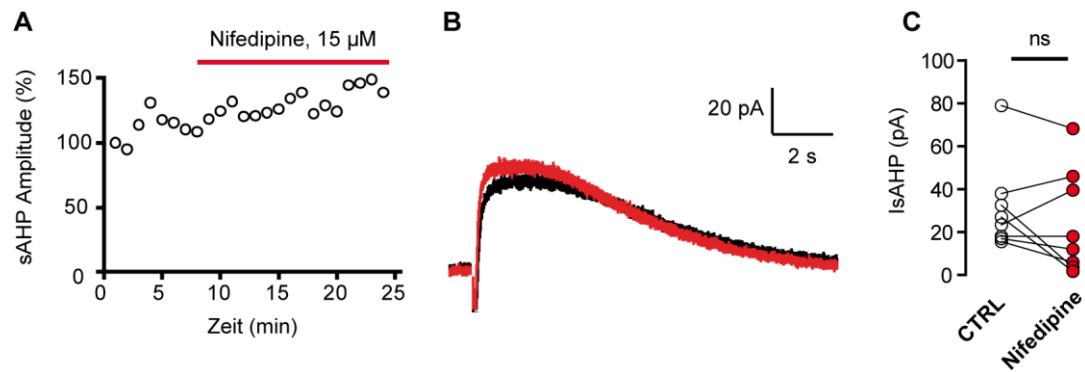


Abb. 19: Der L-Typ-Calciumkanalblocker Nifedipine hat keinen Einfluss auf den sAHP-Strom in Körnerzellen. (A) Das Beispiel einer Messung mit Verwendung von Nifedipine zeigt, dass die sAHP-Stromamplitude mit der Zeit leicht angestiegen ist. (B) Die Stromspuren zeigen ebenfalls eine leichte Zunahme der sAHP-Stromamplitude unter Nifedipine-Einfluss (rot). (C) Die meisten Messungen lassen keine sAHP-Stromabnahme durch den Einsatz von Nifedipine erkennen. Nur in zwei Fällen kam es zu einer stärkeren Abnahme. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Änderung des sAHP-Stroms.

3.2.2.4 Calcium Uncaging führt zu einem Ionenausstrom mit sAHP-Kinetik

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden ob auf eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ein hyperpolarisierender Strom folgt. Sah und Clements konnten bereits einen Strom mit sAHP-Kinetik über das Calcium-Uncaging auslösen (Sah & Clements, 1999). Durch den Einsatz von DM-Nitrophen (siehe Kapitel 2.1.5) konnte in einem Pilotexperiment ($n = 3$) im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Freisetzung von Calcium via Uncaging ebenfalls zu einem Ionenstrom mit sAHP-Strom Kinetik führt. Es wurden verschiedene UV-Puls-längen getestet, die unterschiedlich stark ausgeprägte Stromamplituden auslösten (Abb. 20). Dabei nahm die Stromamplitude mit der Länge des UV-Pulses zu.

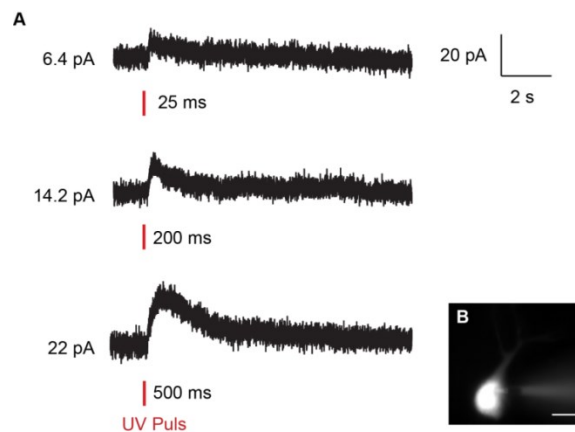


Abb. 20: Das Calcium-Uncaging führte zu einem Ionenausstrom mit sAHP-Strom-Kinetik. (A) Es wurden verschiedene UV-Puls-längen getestet. Je länger der UV-Puls andauerte, desto größer war die Stromamplitude. (B) Das Bild zeigt eine mit Alexa und DM-Nitrophen gefüllte Zelle in einem Uncaging-Experiment. Maßstab: 5 µm.

3.2.3 Calcium-Quelle

Van de Vrede et al. konnten 2007 zeigen, dass der sAHP-Strom in CA1-Neuronen durch eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung (CICR) aus dem endoplasmatischen Retikulum kontrolliert wird (van de Vrede et al., 2007).

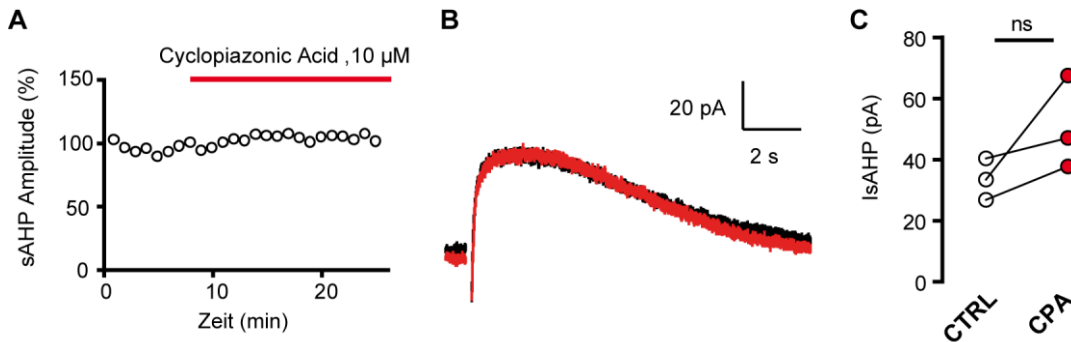


Abb. 21: Die Blockierung der intrazellulären Calciumfreisetzung durch CPA hatte keinen Einfluss auf den sAHP-Strom. (A) Der Zeitverlauf einer Beispiel-Messung zeigt keine Veränderung der sAHP-Stromamplitude in einer Körnerzelle. (B) Die Stromspur zeigt ebenso keine Veränderung in der Amplitudengröße bei CPA-Einsatz (rot). (C) Die einzelnen Messungen zeigten eher eine Zunahme des sAHP-Stroms als eine Abnahme.

Um eine Regulation des sAHP-Stroms über die CICR für die GCs zu testen, wurde die Ca^{2+} -ATPase mit 10 μ M *Cyclopiazonic acid* (CPA, Tabelle 3) blockiert. Nach vier Messungen wurde die Experimentreihe beendet, da eher eine sAHP-Stromamplitudenzunahme (51 ± 26 %, $n = 3$) als -abnahme festgestellt werden konnte (Abb. 21).

3.2.4 Der sAHP-Strom wird durch die Adenylatzyklase moduliert

In vielen Studien wird eine Sensitivität des sAHPs gegenüber einer Neurotransmittermodulation beschrieben (Andrade et al., 2012).

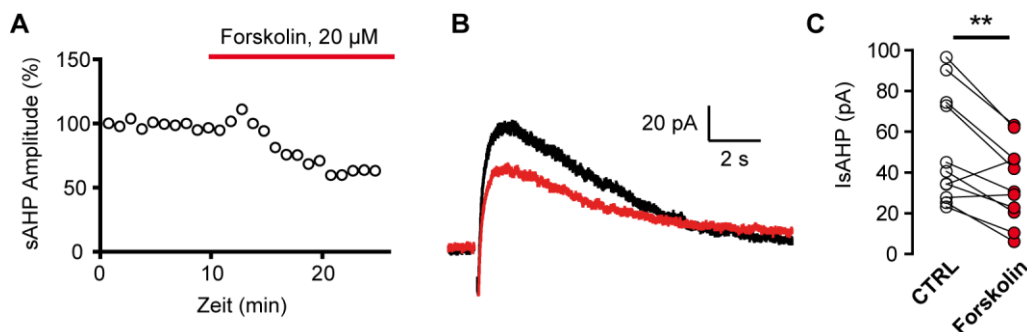


Abb. 22: Die Wirkung des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin auf die sAHP-Stromamplitude. (A) Die Beispiel-Messung zeigt eine deutliche Absenkung des sAHP-Stroms mit Einsatz von Forskolin. (B) Die Stromspuren des sAHP-Stroms lassen eine Abnahme der maximalen Amplitude nach dem Einsatz von Forskolin (rot) erkennen. (C) Der sAHP-Strom nahm mit der Applikation von Forskolin signifikant ab.

Einige Neurotransmitter, die an den G_s -gekoppelten Rezeptor binden, wirken über eine Aktivierung der Adenylatzyklase, welche zu einer Erhöhung von zyklischem AMP führt (siehe Kapitel 1.3.1). Um eine mögliche Modulation des sAHP-Stroms durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase zu überprüfen, wurde Forskolin mit einer Konzentration von 20 μM verwendet (Abb. 22). Bei 9 von 11 gemessenen Zellen, wurde eine Abnahme der sAHP-Stromgröße um $39 \pm 11\%$ ($n = 9$, $p = 0.004$) beobachtet. Alle Messungen zusammengekommen ergeben immer noch eine signifikante Abnahme von $33 \pm 11\%$ ($n = 11$, $p = 0.007$).

3.2.5 KCNQ-Kanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Tzingounis und Kollegen zeigten 2008 bereits, dass ein kleiner Teil des sAHPs (33 %) von CA1-Pyramidenzellen durch den KCNQ-Blocker XE991 gehemmt wird (Tzingounis & Nicoll, 2008). Um die Beteiligung von KCNQ-Kanälen an dem sAHP-Strom von DG-GCs unter den hier beschriebenen Messbedingungen zu untersuchen, wurde 10 μM XE911 verwendet (Abb. 23).

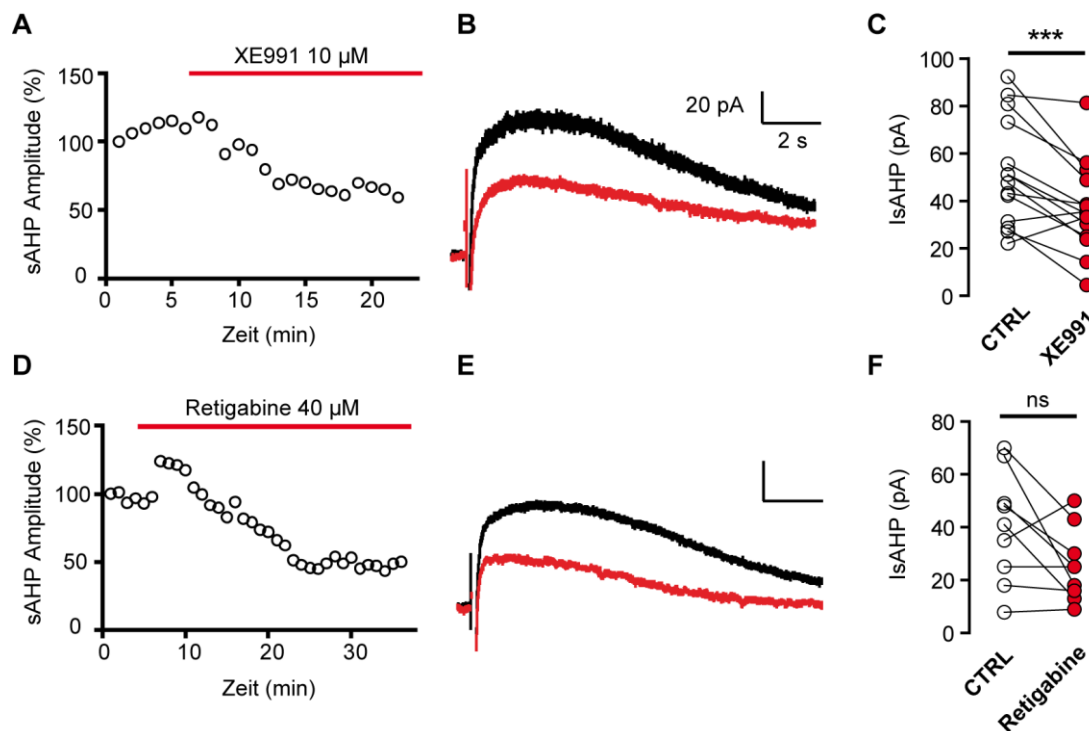


Abb. 23: Die Wirkung von XE991 und Retigabine auf die sAHP-Stromamplitude. (A) Der Zeitverlauf eines Beispiel-Experimentes mit XE991 lässt eine eindeutige Abnahme des sAHP-Stroms erkennen. (B) Die Stromspuren zeigen diese Abnahme ebenso eindeutig (schwarz = CTRL-Lösung, rot = XE991). (C) 10 Zellen zeigten eine signifikante Abnahme des sAHP-Stroms als Antwort auf die XE991-Gabe, während bei vier Zellen keine Veränderung beobachtet werden konnte. (D) Retigabine führte bei Applikation ebenfalls zu einer Abnahme der sAHP-Stromamplitude. (E) Die gemittelten Stromspuren vor (schwarz) und nach (rot) der Applikation von Retigabine zeigen die starke Abnahme der sAHP-Stromamplitude. (F) Bei fünf Zellen konnte eine signifikante Abnahme des sAHP-Stroms beobachtet werden, während bei vier Zellen keine Wirkung auftrat.

Der Einsatz der Substanz führte bei 10 von 14 Zellen zu einer Abnahme von $40 \pm 10\%$ ($n = 10$, $p = 0.002$). Werden die Messungen ohne Wirkung hinzugerechnet ergibt sich immer noch eine signifikante Abnahme des sAHP-Stroms um $30 \pm 10\%$ ($n = 14$, $p = 0.002$). Die Intensität der Wirkung von XE991 auf den sAHP-Strom korrelierte dabei mit der Größe des sAHP-Stroms in der CTRL-Lösung. Je größer der sAHP-Strom zu Beginn der Messung in der CTRL-Lösung war, desto stärker fiel die Wirkung von XE991 auf den sAHP-Strom aus ($n = 14$, $r^2 = 0.298$, $p = 0.04$). Retigabine, eigentlich ein KCNQ-Aktivator, führte bei 5 von 9 Zellen eher zu einer Abnahme als zu einer Zunahme (Abnahme um $53 \pm 10\%$, $n = 5$, $p = 0.06$, Abb. 23 F). Werden alle Zellen zusammen genommen ergibt sich eine Abnahme um $37 \pm 11\%$ ($n = 9$, $p = 0.06$).

3.2.6 ATP-abhängige Kaliumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Die Annahme, dass ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) am sAHP-Strom beteiligt sind, sollte ebenfalls untersucht werden (Tanner et al., 2011). Der Einsatz von $100 \mu\text{M}$ Tolbutamide ließ zwei Populationen von GCs mit unterschiedlicher Beteiligung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen erkennen (Abb. 24 A und B). 17 Zellen zeigten nach Einsatz von Tolbutamide eine Abnahme der maximalen sAHP-Stromamplitude um $60 \pm 7\%$ ($p = 0.0003$, Abb. 24 A), die restlichen 10 wiesen keine Amplitudenänderung im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 24 B). Alle Messungen zusammen ergaben immer noch eine signifikante Abnahme des sAHP-Stroms um $42 \pm 7\%$ ($n = 27$, $p = 0.0002$). Es konnte eine Korrelation zwischen der sAHP-Stromgröße in der CTRL-Lösung und der Amplitudenänderung bei Tolbutamide-Applikation gefunden werden. Je größer die Amplitude zu Beginn der Messung in der CTRL-Lösung war, desto größer fiel auch die Abnahme unter Tolbutamide-Einfluss aus ($n = 27$, $r^2 = 0.636$, $p < 0.0001$).

In einem zweiten Versuch wurde die Wirkung von Diazoxide getestet. Diazoxide soll die Offenwahrscheinlichkeit von K_{ATP} -Kanälen erhöhen (Larsson et al., 1993; Shyng et al., 1997). Im Gegensatz zu den Tolbutamide-Experimenten konnte hier bei jeder sAHP-Strommessung mit Verwendung von $100 \mu\text{M}$ Diazoxide eine erhöhende Wirkung auf den sAHP-Strom beobachtet werden (Abb. 24 E). Die Zunahme betrug im Mittel $51 \pm 15\%$ ($n = 12$, $p = 0.0005$).

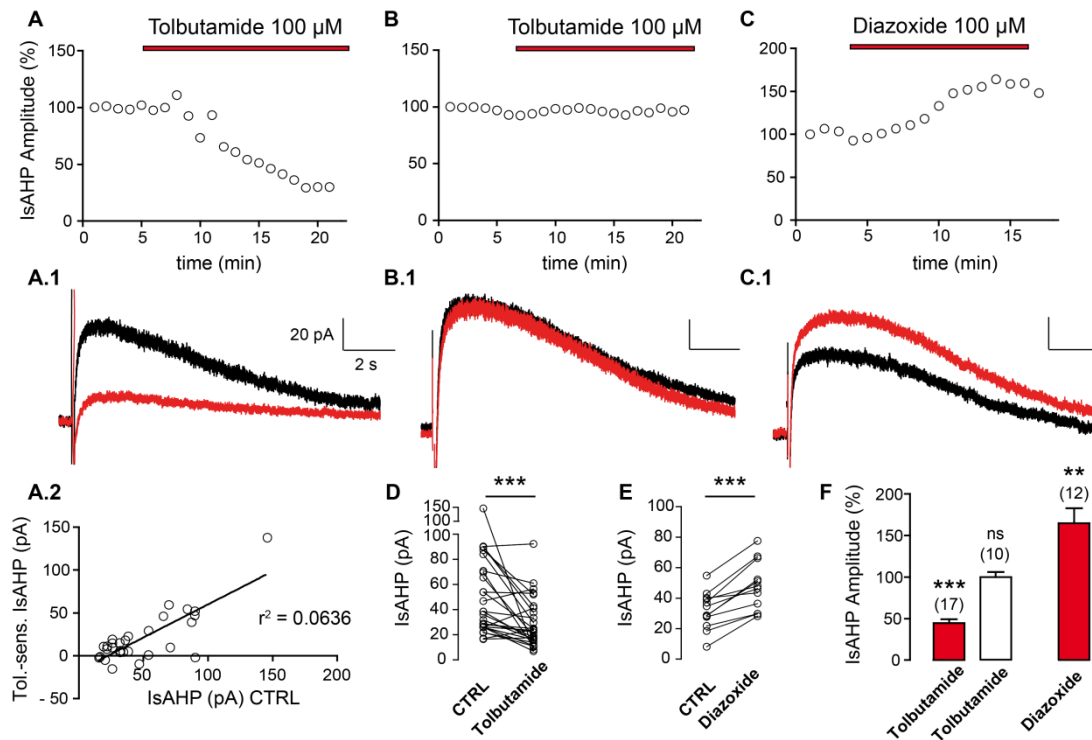


Abb. 24: Der Einfluss des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamide und des Aktivators Diazoxide auf den sAHP-Strom. (A) Der Zeitverlauf einer Messung mit Tolbutamide. Der sAHP-Strom nahm mit Einsatz von Tolbutamide stark ab. (A.1) Die Abnahme zeigt sich auch in den Stromspuren vor (schwarz) und nach der Applikation (rot). (A2) Die lineare Regression zeigt eine Korrelation zwischen der sAHP-Stromgröße in der CTRL-Lösung und der Stromgrößenänderung bei Tolbutamide-Verwendung. Je größer der sAHP-Strom in der CTRL-Lösung zu Beginn des Experimentes war, desto größer fiel auch die Abnahme unter Tolbutamide-Einfluss aus. (B) Es gab jedoch auch Zellen, da zeigte sich keine Veränderung in der sAHP-Stromausprägung. Der Graph zeigt eine über die Zeit stabile maximale sAHP-Stromamplitude. Diese bleibt auch unter Tolbutamide-Einfluss stabil. (B.1) Die Stromspuren zeigen keine Veränderung des sAHPs bei Tolbutamide-Applikation. (C) Im Einzelexperiment lässt der Diazoxide-Einsatz eine Zunahme des sAHP-Stroms erkennen. (C.1) Die Stromspuren zeigen eindeutig die Zunahme der sAHP-Stromamplitude bei Diazoxide-Applikation. (D) Der Graph enthält die Datenpunkte der einzelnen Experimente, unter CTRL-Bedingungen und Tolbutamide-Einfluss. Hier kann beobachtet werden, dass einige Zellen keine sAHP-Stromabnahme bei Tolbutamide-Einsatz zeigten ($n = 27$). Das Gesamtergebnis ist dennoch signifikant. (E) Die einzelnen Experimente mit Diazoxide zeigen eine konstante Zunahme der sAHP-Stromamplitude ($n = 12$). (F) Das Balkendiagramm zeigt die verbleibende sAHP-Stromamplitude nach dem Einsatz von Tolbutamide und Diazoxide. Die Körnerzellen lassen sich anhand der Sensitivität zu Tolbutamide in zwei Gruppen einteilen: Bei 17 Zellen blieb nach Tolbutamide-Applikation nur noch etwa 40 % der Ausgangsamplitude, bei 10 Zellen zeigte sich keine Wirkung. Bei den Diazoxide-Experimenten hingegen ist bei jeder Zelle eine Wirkung zu erkennen.

3.2.7 Der sAHP-Strom ist Natrium-abhängig

Bisher sind kaum sAHPs mit Natriumabhängigkeit bekannt (Schwindt et al., 1989; Wallen et al., 2007). Die Existenz von Natrium-abhängigen Kaliumkanälen ist jedoch seit 1984 erwiesen (Kameyama et al., 1984). Um die Natriumabhängigkeit des sAHP-Stroms von GCs zu testen, wurde mit einer ACSF-Lösung, in welcher das Natriumchlorid durch Cholinchlorid ersetzt wurde (Abb. 25), gearbeitet (Tabelle 3). Die maximale sAHP-Stromamplitude nahm mit dieser um $70 \pm 3\%$ ab ($n = 9$, $p = 0.004$). Das Ergebnis zeigt also, dass ein Teil des sAHP-Stroms Natrium-abhängig ist.

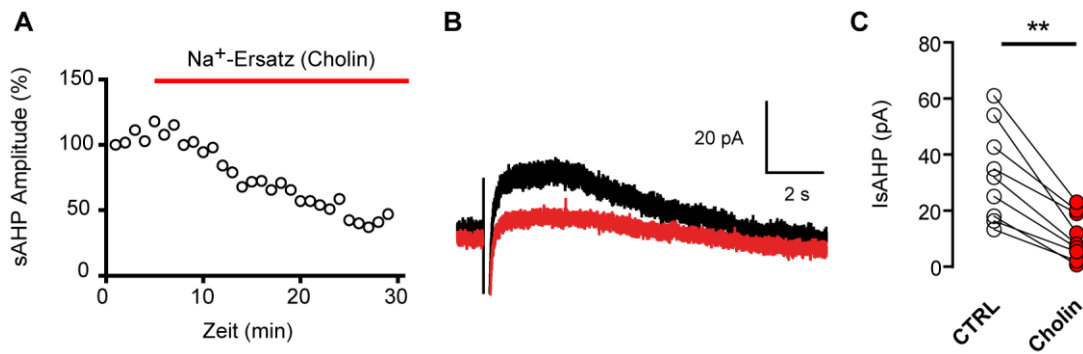


Abb. 25: Die Wirkung einer Natrium-freien ACSF-Lösung auf den sAHP-Strom. Das Natriumchlorid in der ACSF-Lösung wurde durch Cholinchlorid ersetzt. (A) Das Beispiel-Experiment zeigt, dass die Umspülung des Akutschchnittes mit Natrium-freier ACSF-Lösung eine Abnahme der sAHP-Stromamplitude auslöste. (B) Die Stromspuren zeigen ebenfalls die Abnahme durch die Cholinchlorid-Lösung (rot). (C) Das Diagramm zeigt, dass bei jeder Messung eine sAHP-Stromabnahme unter Cholin-Einfluss erfolgte.

3.2.8 Spannungsabhängige Natriumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Um die Natriumquelle für die Natriumabhängigkeit des sAHP-Stroms weiter zu untersuchen, wurde zunächst der Breitbandblocker Lidocain (Tabelle 3) verwendet. Lidocain ist ein Lokalanästhetikum und blockiert die spannungsabhängigen Natriumkanäle $\text{Na}_v1.1 - \text{Na}_v1.9$ (Hille, 1977). In diesen Experimenten konnte mit der Verwendung von 10 mM Lidocain ein nahezu vollständiger Block des sAHP-Stroms erreicht werden (Abnahme um $92 \pm 1\%$, $n = 6$, $p = 0.03$, Abb. 26). Da die TTX-sensitiven Natriumkanäle $\text{Na}_v1.1 - \text{Na}_v1.7$ (Tabelle 2) bereits durch das TTX in der CTRL-Lösung blockiert waren und diese Lösung in einer Erhöhung der sAHP-Stromamplitude statt in einer Abnahme resultierte (Abb. 12), könnte davon ausgegangen werden, dass die Lidocainwirkung über eine Blockierung der TTX-insensitiven Natriumkanäle zustande kam.

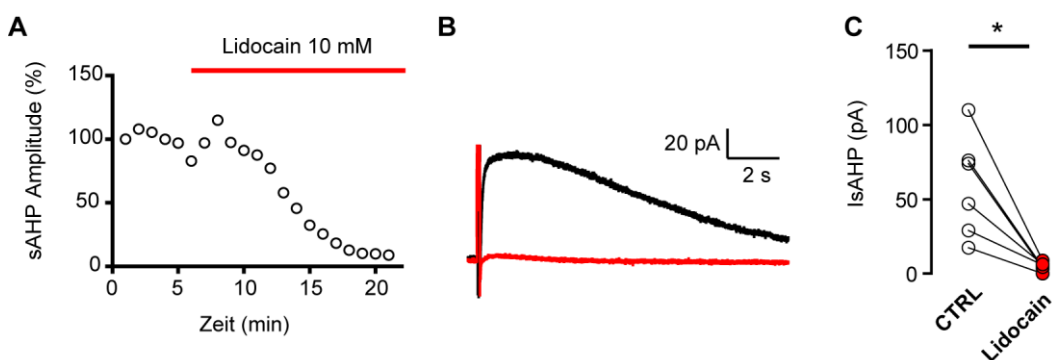


Abb. 26: Die Wirkung des Breitbandblockers Lidocain auf den sAHP-Strom. (A) Das Beispiel-Experiment zeigt, dass die sAHP-Stromamplitude mit Einsatz von Lidocain stark abnahm. (B) Die gemittelten Stromspuren zeigen diese Abnahme durch Lidocain (rot) ebenfalls deutlich. Der sAHP-Strom verschwindet fast komplett. (C) Bei jeder Messung blieb nach Lidocain-Applikation nur noch ein kleiner sAHP-Reststrom übrig.

3.2.9 Natrium-abhängige Kaliumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Die Tatsache, dass ein Teil des sAHP-Stroms Natrium-abhängig ist, lässt auf die Beteiligung von Natrium-abhängigen (K_{Na}) Kaliumkanälen schließen (Franceschetti et al., 2003; Schwindt et al., 1989). Im Rahmen dieser Arbeit führte das u.a. als K_{Na} -Kanalblocker verwendete Quinidine in einigen Zellen zu einer vollständigen Abnahme des sAHP-Stroms (Abb. 27). Im Mittel sank die Amplitude um $95 \pm 2 \%$ ($n = 7$, $p = 0.02$).

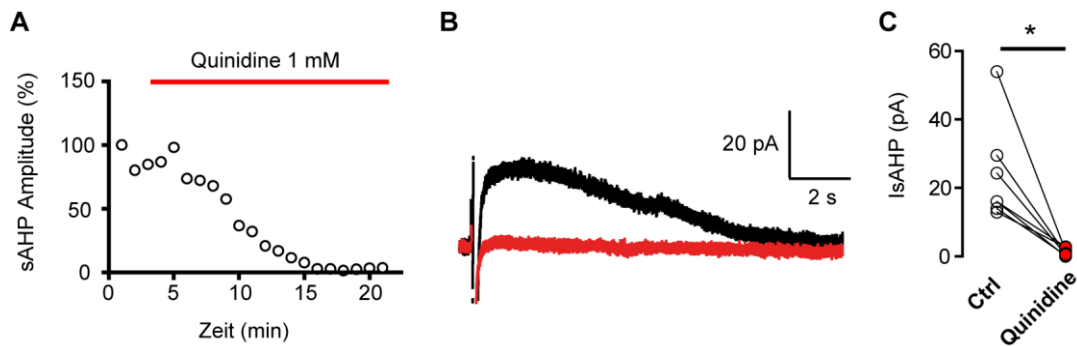


Abb. 27: Die Wirkung des K_{Na} -Kanalblockers Quinidine auf die sAHP-Stromamplitude von Körnerzellen. (A) Der Einsatz von Quinidine führte zu einem starken Abfall des sAHP-Stroms. Bei dem Beispiel-Experiment wurde die sAHP-Stromamplitude vollständig blockiert. (B) Die Stromspuren zeigen diese Abnahme ebenfalls deutlich. Der Strom ist nach Quinidine-Applikation kaum noch messbar (rot). (C) Die einzelnen Quinidine-Experimente lassen eine eindeutige, signifikante Abnahme des sAHP-Stroms erkennen.

3.2.10 Slack-Kanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Kaliumkanäle der K_{Na} -Familie werden durch die Gene Slick und Slack kodiert (Kaczmarek, 2013). Die Slack-Kanäle wurden zuvor bereits mit dem sAHP-Strom in Zusammenhang gebracht (Wallen et al., 2007).

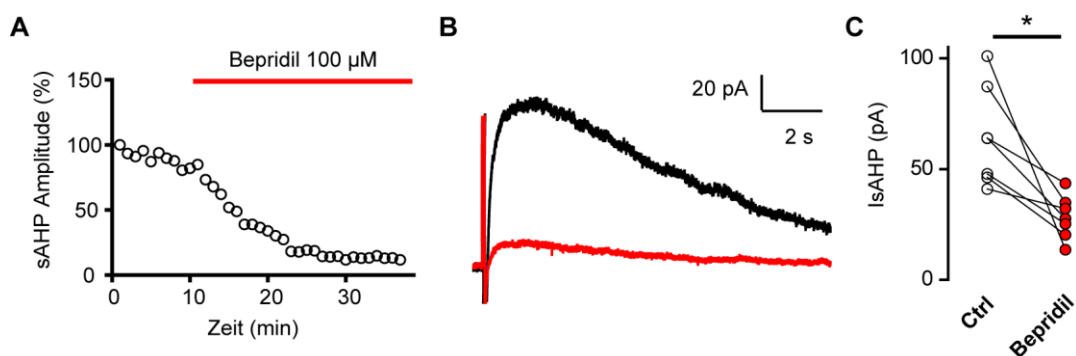


Abb. 28: Der Einsatz des Slack-Kanalblockers Bepridil führte zu einer Abnahme des sAHP-Stroms. (A) In dem Beispiel-Experiment führte die Applikation von Bepridil zu einer starken Abnahme der sAHP-Stromamplitude. (B) Die Stromspuren zeigen eine eindeutige Abnahme bei Bepridil Einsatz (rot). (C) Alle Messungen zusammen zeigten eine signifikante sAHP-Strom Reduktion mit der Applikation von Bepridil.

Um zu testen ob die Slack-Kanäle auch für die Beteiligung am sAHP-Strom in GCs in Frage kommen, wurde die Wirkung von dem u.a. als Slack-Blocker verwendeten Bepridil auf die sAHP-Stromamplitude untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass

100 μM Bepridil einen großen Teil des sAHP-Stroms blockiert. Der Strom nahm unter Bepridil-Einfluss um $56 \pm 6 \%$ ($n = 7$, $p = 0.02$) ab (Abb. 28).

3.2.11 Die ATP-abhängige Na^+/K^+ -Pumpe und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) sind nicht am sAHP-Strom beteiligt

Die Natrium-Sensitivität könnte auch für eine indirekte Beteiligung der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Pumpe am sAHP-Strom sprechen (Gulledge et al., 2013). 20 μM des Giftes Ouabain, welches diese Pumpe inhibiert, führten jedoch zu keiner Veränderung der sAHP-Stromamplitude (Zunahme um $4 \pm 11\%$, $n = 9$, $p = 1$, nicht gezeigt).

Da die vorherigen Ergebnisse eine ungewöhnliche doppelte Abhängigkeit des sAHP-Stroms sowohl von Calcium, als auch von Natrium vermuten lassen, stellte sich die Frage, wie diese Beobachtung argumentiert werden könnte. Eine mögliche Erklärung wäre die Involvierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, welcher Natrium nach außen und Calcium als Austausch ins Zellinnere transportiert (Jeffs et al., 2007). Wenn der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher das für den sAHP-Strom notwendige Calcium stellen würde, dann könnte damit sowohl die Resistenz des sAHP-Stroms gegen den gängigen Na_v -Blocker TTX erklärt werden, als auch die doppelte Calcium- und Natriumabhängigkeit. Um diese Hypothese zu überprüfen, kam 10 μM des Blockers CGP-37157 zum Einsatz. Die Blockade von NCX löste keine Veränderung der sAHP-Stromamplitude aus (Zunahme um $5 \pm 23 \%$, $n = 4$, $p = 1$, Abb. 29).

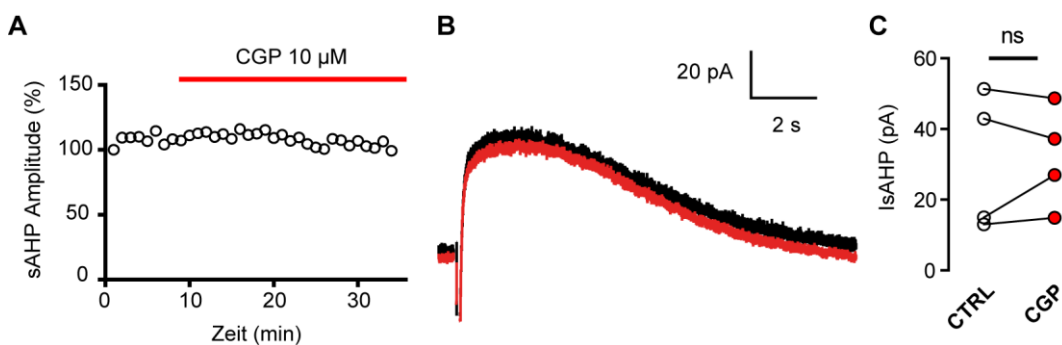


Abb. 29: Die Blockade des Natrium-Calcium-Austauschers NCX bewirkte keine Veränderung des sAHP-Stroms. (A) Das Beispiel einer Messung mit CGP-Applikation zeigt, dass der sAHP-Strom die ganze Messung über eine konstante Größe zeigte. (B) Die sAHP-Stromspur blieb also bei CGP-Applikation unverändert. (C) Die Daten der einzelnen Messungen zeigen, dass sich die sAHP-Stromamplitude unter CGP Einfluss nicht stark veränderte.

3.2.12 K_{ATP} - und KCNQ -Kanal Beteiligung am sAHP-Strom

Die Beteiligung von K_{ATP} - und KCNQ -Kanälen am sAHP-Strom konnte in Kapitel 3.2.5 und 3.2.6 gezeigt werden. Nun war die Frage in welchem Verhältnis diese Kanäle zum sAHP-Strom beitragen. Deshalb wurden die entsprechenden Blocker Tolbutamide, XE991 zusammen mit Nickel in einem kombinierten, pharmakologischen Experiment getestet (Abb. 30). Dabei wurden die Zellen zunächst entweder mit Tolbutamide oder XE991 umspült. Nachdem sich der sAHP-Strom auf eine *baseline* eingependelt hatte,

wurden beide Blocker zusammen appliziert, um dann nach wiederholtem Einpendeln des Stroms eine Lösung mit beiden Blockern und Nickel hinzuzugeben.

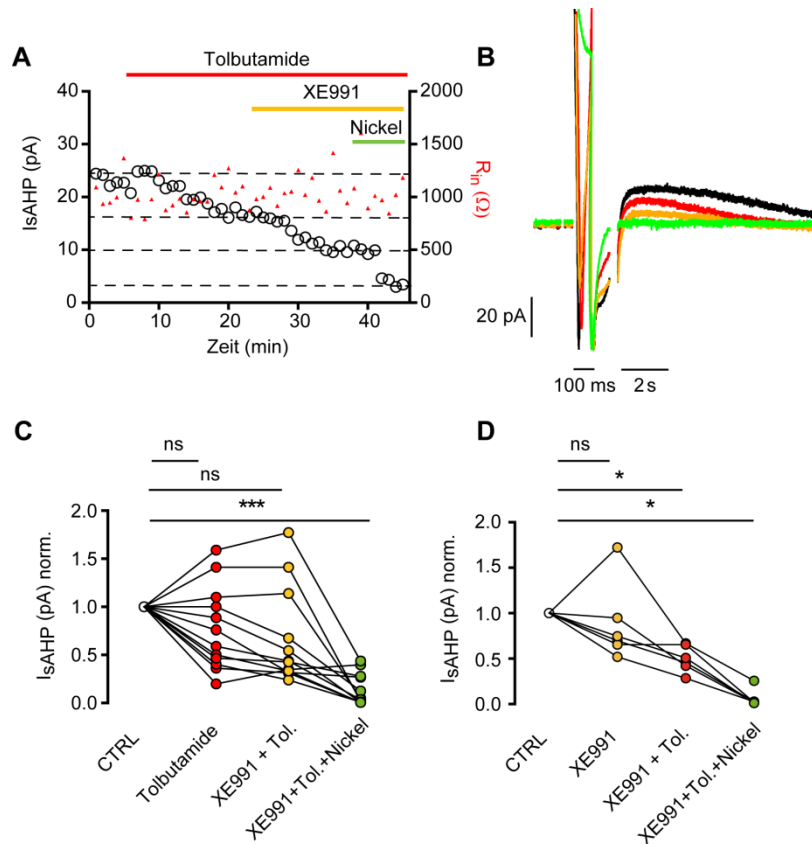


Abb. 30: Die Untersuchung des sAHP-Stroms in einem Stufenexperiment mit Einsatz von Tolbutamide, XE991 und Nickel. (A) Ein Beispiel für ein Stufenexperiment mit dem K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamide und dem KCNQ-Kanalblocker XE991. Der sAHP-Strom nahm mit Applikation von Tolbutamide ab und pendelte sich auf eine neue sAHP-Stromgröße ein. Nach der Etablierung der neuen sAHP-Strom *baseline*, wurde XE991 zusammen mit Tolbutamide appliziert. Der sAHP-Strom reduzierte sich daraufhin wieder. Die zusätzliche Applikation von Nickel führte dann zu einem endgültigen Block des sAHP-Stroms. (B) Die sAHP-Stromspuren zeigen die Abnahme durch die Blocker. Der CTRL-Strom (schwarz) nahm durch Tolbutamide (rot) an Größe ab. Er reduzierte sich weiter durch die zusätzliche Verwendung von XE991 (orange) und wurde endgültig durch die weitere Applikation von Nickel blockiert (grün). (C) Die Diagramme zeigen die normierten sAHP-Stromwerte in der CTRL und nach aufeinanderfolgender Applikation von Tolbutamide, XE991 und Nickel. Es wird eine inkonsistente Wirkung der Blocker XE991 und Tolbutamide deutlich.

Mit den Blockern Tolbutamide und XE991 konnte keine konsistente Wirkung beobachtet werden. Dabei zeigten 33 % der gemessenen Zellen eine etwa gleiche Beteiligung von KCNQ- und K_{ATP} -Kanälen, 50 % die alleinige Beteiligung einer der beiden Kanäle und 17 % gar keine Beteiligung der beiden Kanäle am sAHP-Strom (Abb. 30 C und D). Unter Nickelbeigabe wurde der sAHP-Strom jedoch jedes Mal blockiert. Wenn Tolbutamide zuerst appliziert wurde, kam es im Mittel zu einer Abnahme der sAHP-Stromamplitude von 23 ± 0.1 % ($p = 0.1$), zusammen mit XE991 dann nochmal um 13 ± 0.1 % ($p = 0.1$) und mit Nickel zu einer Abnahme von 73 ± 0.1 % ($n = 12$, $p = 0.001$, Abb. 30 C). Wenn XE991 zuerst appliziert wurde nahm der sAHP-Strom im Mittel um 12 ± 0.2 % ($p = 0.4$) ab, mit Tolbutamide zusammen nochmal um 38 ± 0.1 % ($p = 0.06$) und mit Nickel konnte der Strom um 89 ± 0.1 % reduziert werden ($p = 0.003$, Abb. 30 D).

3.3 Die Etablierung der *Knock Down*-Technik

Da die pharmakologischen Ergebnisse von der Selektivität der Blocker und Aktivatoren abhängt und diese in einigen Fällen nicht präzise genug ist, sollte die Identität der dem sAHP-Strom zugrunde liegenden Ionenkanäle in Zukunft mittels RNA-Interferenz verifiziert werden. Mit miRNA kann die Proteinsynthese der Hauptkandidaten gezielt verhindert und die Auswirkungen auf den sAHP-Strom untersucht werden. Um dies zu erreichen, musste zunächst ein System gefunden werden miRNA in GCs zu schleusen. Für diese Arbeit fiel die Entscheidung auf die BLOCK-iT™ miRNA-Methode von Invitrogen, die den einfachen Einbau der miRNA in DNA-Expressionsvektoren erlaubt. Über diese Expressionsvektoren kann die miRNA in Zellen geschleust werden. Da die bisher verwendeten Akutschnitte nicht lange genug überleben um Proteinsynthese zu modifizieren, stellten in dieser Arbeit organotypische Schnittkulturen das Zielgewebe dar, welche Langzeitstudien unter größtmöglichen physiologischen Bedingungen erlauben (Kapitel 2.2.2).

Die Grundeigenschaften der Körnerzellen in organotypischen Schnittkulturen. Um die organotypischen Schnittkulturen für den Einsatz von RNA-Interferenz und einer anschließenden Untersuchung des sAHP-Stroms zu nutzen, musste zunächst geklärt werden ob die Elektrophysiologie der GCs in OHSCs mit der des Akutschnittes vergleichbar ist. Tabelle 15 zeigt, dass alle elektrophysiologischen Eigenschaften der GCs in OHSCs mit denen im Akutschnitt übereinstimmten, mit Ausnahme der AP-Amplitude und des V_{Rest} . Die AP-Amplitude liegt im Vergleich zum Akutschnitt um $18 \pm 13 \%$ erhöht vor. Der V_{Rest} weicht nur um $6 \pm 3 \%$ ab.

Tabelle 15: Elektrophysiologische Messparameter von durchgeführten Patch-Clamp-Messungen an organotypischen Schnittkulturen (OHSC) und Basis-Eigenschaften von Körnerzellen in OHSCs. Aufgeführt sind die Signifikanzwerte, die aus dem Vergleich der Eigenschaften der GCs im OHSC und der Eigenschaften im Akutschnitt hervorgehen. Es gibt bis auf das V_{Rest} und die Ausprägung der AP-Amplitude (AP-Amp) keine Abweichung bei den getesteten Parametern.

	OHSC	Unterschied zu Akut
R_{pip}	$5.4 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$ (n = 21)	$p = 0.14$, ns
R_{ser}	$15.8 \pm 0.9 \text{ M}\Omega$ (n = 19)	$p = 0.73$, ns
R_{seal}	$12.8 \pm 1.9 \text{ G}\Omega$ (n = 24)	$p = 0.28$, ns
R_{in}	$664 \pm 73 \text{ M}\Omega$ (n = 22)	$p = 0.10$, ns
V_{Rest}	$-78.2 \pm 2.1 \text{ mV}$ (n = 24)	$p = 0.01^*$
τ_m	$35.7 \pm 9.5 \text{ ms}$ (n = 12)	$p = 0.66$, ns
Rheobase	$80.1 \pm 15.3 \text{ pA}$ (n = 13)	$p = 0.09$, ns
Schwellen-wert	$-38.9 \pm 2.2 \text{ mV}$ (n = 21)	$p = 0.37$, ns
AP-Dauer	$1.2 \pm 0.1 \text{ ms}$ (n = 21)	$p = 0.66$, ns
AP-Amp	$71.2 \pm 7.8 \text{ mV}$ (n = 21)	$p = 0.004^{**}$
sAHP-Strom ACSF	$33 \pm 6.3 \text{ pA}$ (n = 13)	$p = 0.73$, ns
sAHP-Strom CTRL	$37 \pm 9.3 \text{ pA}$ (n = 12)	$p = 0.87$, ns

Da die sAHP-Stromamplitudengrößen in ACSF- und der CTRL-Lösung nicht von denen im Akutschnitt abweichen, sollte im nächsten Schritt ansatzweise getestet werden ob die Pharmakologie ebenfalls vergleichbar ist.

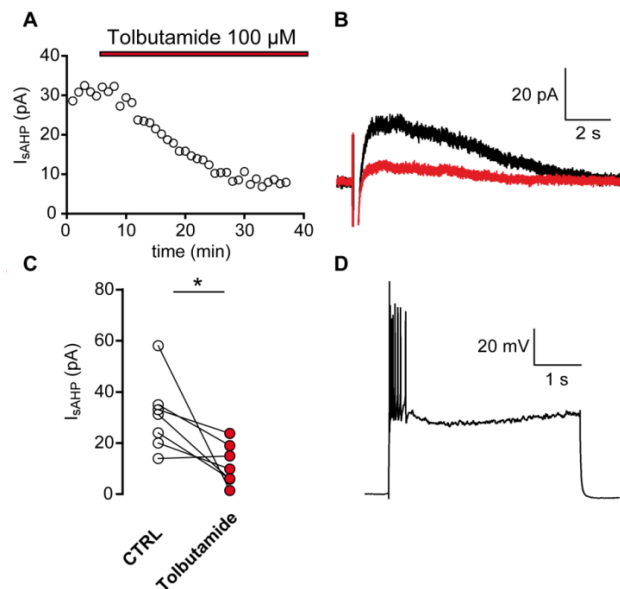


Abb. 31: Die Wirkung des K_{ATP} Blockers Tolbutamide auf den sAHP-Strom von Körnerzellen im OHSC und der funktionelle Phänotyp. (A) Die Beispiel-Messung zeigt, dass der sAHP-Strom durch die Applikation von Tolbutamide stark reduziert wurde. (B) Die Stromspuren zeigen ebenfalls eine Abnahme des sAHP-Stroms unter Tolbutamide Einfluss (rot). (C) Der Graph zeigt die einzelnen Experimente mit Tolbutamide-Einsatz. Die Abnahme des sAHP-Stroms während der Tolbutamide-Applikation ist signifikant. (D) Der funktionelle Phänotyp von Körnerzellen im OHSC zeigt ebenfalls das *burst*-Verhalten in cc-Messungen.

Tatsächlich konnten mit dem K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamide, der bereits im Akutschnitt zu einer gemittelten sAHP-Stromabnahme von $41 \pm 7 \%$ führte, eine Reduktion von $79 \pm 8 \%$ beobachtet werden (Abb. 31). Die Ergebnisse zeigen, dass die Elektrophysiologie von GCs im OHSC mit kleinen Abweichungen derjenigen von GCs im Akutschnitt entspricht und die OHSCs somit für weitere Untersuchungen des sAHP-Stroms zum Einsatz kommen können.

3.3.1 Transfektion des pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR via Lipofectamine

Da die Übertragung der miRNA-kodierenden DNA in die GCs nicht wie geplant funktionierte, wurden verschiedene Transfer-Techniken angewendet, die hier chronologisch beschrieben sind. Begonnen wurde mit dem Gentransfer des Expressionsvektors pcDNATM6.2 GW/EmGFP-miR via der Lipofectamine-Methode.

Nachdem die miRNA-kodierende DNA-Sequenz in den Expressionsvektor mittels Ligase-Reaktion eingebaut wurde (Abb. 32 A-C), wurden die Proben mit korrekter Plasmid-DNA über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen SacI und EcoRV ermittelt (Abb. 32 C) und zur Absicherung sequenziert.

Transfektion des miRNA-Expressionsvektors via Lipofectamine. Im nächsten Schritt sollte das fertige Plasmid mit der miRNA-kodierenden DNA in die Zellen der OHSCs gebracht werden. Dafür kam zunächst Lipofectamine® 2000 von Invitrogen zum Einsatz. Die DNA-Lipofectamine-Lösung wurde entweder in vier Schritten mit 30-minütiger Inkubationszeit als Tropfen auf die Schnittoberfläche gebracht, die Schnittkulturen von oben mit einem größeren Volumen der Lösung benetzt oder die Lösung in das Zellkulturmedium gegeben. Die letzteren beiden Methoden brachten nur sehr geringe Transfektionserfolge von höchstens zehn Zellen pro OHSC, so dass die Wahl der Transfertechnik auf die Tropfenmethode fiel. Für die Transfektion wurden sowohl unterschiedliche DNA-, wie auch verschiedene Lipofectamine-Konzentrationen getestet. Zum Einsatz kamen zum einen der Kontroll-Expressionsvektor pcDNA6.2-eGFP und zum anderen der pcDNA6.2-miR-Kcnj11 (siehe Oligonukleotide in Tabelle 4). Die höchste Transfektionsrate konnte mit 9 μ l Lipofectamine und einem DNA-Einsatz von 3.5 μ g, also einem Verhältnis von ca. 3:1 (w/w), erzielt werden. Dieses wurde bereits von anderen Studien als optimal beschrieben (Murray et al., 1999). Die meisten GFP-exprimierenden Zellen traten dabei 6 Tage nach der Transfektion auf (Abb. 32 E). Mit 12 μ l Lipofectamine wurde ein erhöhtes Zellsterben beobachtet.

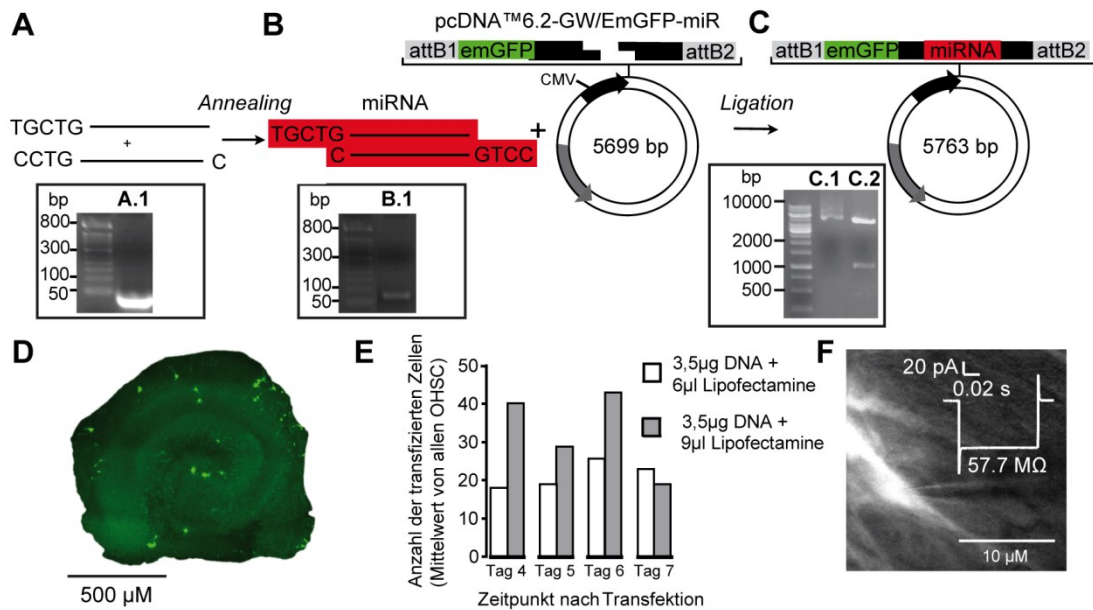


Abb. 32: Klonierung des RNAi-kodierenden DNA-Plasmids pcDNATM6.1GW-miR-Kcnj11 und Transfer des Plasmids via Lipofectamine in organotypische Schnittkulturen. (A) Die miRNA-kodierenden Oligonukleotide wurden als Einzelstränge geliefert. (A.1) Die mit einem Farbstoff und UV-Licht sichtbar gemachten, relativ kleinen Einzelstränge wanderten im Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes über die 50 bp-Bande des DNA-Leiters hinaus. (B,B.1) Nach dem Aneinanderlagern (*Annealing*) der Einzelstränge wanderte die doppelsträngige DNA im Gel weniger weit und befand sich oberhalb der 50 bp-Bande. Die doppelsträngige miRNA-kodierende DNA konnte daraufhin in den Expressionsvektor pcDNATM6.1GW/EmGFP-miR via Ligation eingebaut werden. (C) Die miRNA wurde in eine Expressionskassette eingebaut, die hinter dem CMV-Promotor liegt. Die Expressionskassette enthält die miRNA-flankierenden Sequenzen, eine emGFP-kodierende DNA-Sequenz und die Rekombinationsstellen attB1 und attB2. Der Expressionsvektor enthält außerdem noch ein Spectinomycin-Resistenzgen zur Selektion der positiven Klone (grauer Pfeil). Das Gelbild zeigt zum einen eine Kontrollbande des unbehandelten DNA-Vektors (C.1) und zum anderen zwei aufgetrennte DNA-Banden (C.2) bei 1062 und 4701 bp, welche durch den Restriktionsverdau des miRNA-kodierenden DNA-Plasmids mit SacI und EcoRV zustande kamen und eine erfolgreiche Ligation anzeigen. (D) Das Bild zeigt einen unter dem Mikroskop aufgenommenen OHSC, der mit einer Lösung aus Lipofectamine und pcDNATM6.1GW/EmGFP-miR behandelt wurde. Unter Anregung mit Licht der Wellenlänge ~480 nm konnte das emGFP in den transfizierten Zellen sichtbar gemacht werden. Es leuchteten nur einige wenige Zellen, vor allem am Rand der Schnittkultur. (E) Der Graph stellt die gemittelte Anzahl der transfizierten Zellen von OHSCs dar. Es wird die unterschiedliche Dauer nach der Transfektion bis zur Visualisierung gegenüber gestellt. Die Zusammenfassung der Daten zeigt, dass mit 9 µl Lipofectamine (grau) die höchste Transfektionsrate erzielt werden konnte. Es wurden jedoch höchstens knapp über 40 Zellen transfiziert. Am Tag 6 scheint es einen Höhepunkt der GFP-exprimierenden Zellen zu geben. (F) Eine Patch-Clamp-Pipette an einer fluoreszierenden Zelle in einem transfizierten OHSC Schnitt, aufgenommen von der Axioskop2 FS. Beim Messen der fluoreszierenden Zellen wurde deutlich, dass es sich nicht um Neurone handelte. Der Eingangswiderstand war bei dieser Zelle sehr niedrig mit 57.7 MΩ, außerdem zeigte sie keine Aktionspotentiale, was für eine transfizierte Gliazellen oder aber neuronale Stammzelle spricht.

Jedoch war die Transfektionsrate mit dem Einsatz beider DNA-Vektoren viel zu niedrig. Es wurden höchstens knapp über 40 Zellen transfiziert, welche der Morphologie entsprechend wahrscheinlich in den meisten Fällen Gliazellen waren. Diese Vermutung wurde bestätigt als elektrophysiologische Messungen von fluoreszierenden Zellen einen extrem niedrigen Eingangswiderstand und keine Aktionspotentiale als Antwort auf starke Spannungspulse aufwiesen (nicht gezeigt).

Da die Lipofectamine-Methode in Transfektionsexperimenten mit OHSC nur sehr geringe Transferraten hervorbrachte, wurde im nächsten Schritt der Virus als Transfermittel von DNA in die Zellen der OHSC gewählt.

3.3.2 Präparation des pAd/CMV/EmGFP-miR™

Um die miRNA- und emGFP-kodierende Sequenz (Expressionskassette) in ein adenovirales Plasmid zu bringen, wurde diese aus dem pcDNA6.2 miRNA Plasmid (z.B. dem pcDNA6.2-miR-Kcnj11) in die adenovirale DNA pAd/CMV/EmGFP-miR™ via einer Gateway Reaktion transferiert (Abb. 33). Die Zwischenprodukte und das Endprodukt konnten über einen Restriktionsverdau und eine abschließende Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft werden (Abb. 33). Für die BP-Reaktion wurden zunächst 1-2 µg des miRNA-kodierenden pcDNA6.2-Plasmids über einen Restriktionsverdau mit Eco521 linearisiert. Nach einer Gelelektrophorese zeigte sich unter UV Licht, dass sich bei der linearisierten DNA eine deutliche Bande abgrenzen ließ (Abb. 33 A.2), wohingegen die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Konformation der Moleküle eine Spur auf dem Gel hinterlässt. Aufgrund ihrer Kompaktheit wanderte diese im elektrischen Feld etwas schneller als die linearisierte DNA (Abb. 33, A.1). In einer BP-Reaktion wurde die Expressionskassette dann in einen Zwischenvektor, den pDONR™221, mit attP-Erkennungsstellen eingebaut. Daraus resultierte dann das pENTRY-Plasmid mit attL-Erkennungsstellen, welches über das Antibiotikum Kanamycin von den negativen Klonen isoliert werden konnte. Über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym PvuI konnte der Einbau der Expressionskassette überprüft werden. Im Vergleich mit der 1 kB DNA-Leiter wanderten die Banden im elektrischen Feld in etwa auf die Höhe von 900 und 2660 Basenpaaren (bp) und zeigten damit den erfolgreichen Einbau der Kassette an (Abb. 33 B.2). In einer LR-Reaktion wurde das pENTRY-Plasmid zusammen mit dem pAd/CMV/EmGFP-miR™ und einer LR-Klonase inkubiert und das entstandene Plasmid über den Zusatz von Ampicillin im Nährmedium selektiert. Der Austausch der Expressionskassette aus dem pENTRY-Plasmid mit dem *ccdB*-Gen aus dem adenoviralen Plasmid, wurde über einen Restriktionsverdau mit EcoRI getestet. Tauchten die Banden nach einer Elektrophorese auf der Höhe von 27396, 6772, 1994 und 526 bp auf, war die Klonierung erfolgreich (Abb. 33 C.2). Weil der sAHP-Strom v.a. XE- und Tolbutamide-sensitive war, wurden zunächst adenovirale Plasmide mit miRNA gegen die KCNQ2-Untereinheit (UE) mit der Kodierung Mmi512536 und Mmi512537 (pAd-miRNA-Kcnq2_36, 37), die K_{ir}6.1-UE (pAd-miRNA-Kcnj8_89, Mmi512489) und die K_{ir}6.2-UE des K_{ATP}-Kanals mit der Kodierung Mmi512452 (pAd-miRNA-Kcnj11_52) hergestellt (siehe Anhang, ab Seite 101).

Nachdem die adenovirale Plasmid-DNA durch eine Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft wurde, wurde diese an das Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung (IEGT) zur Produktion des Adenovirus weitergeleitet. Dabei entstanden zunächst die beiden Adenoviren Ad/CMV-miRNA-Kcnj11_52 und Ad/CMV-miRNA-Kcnq2_36 (ab Seite 101). Das IEGT stellte außerdem einen Kontroll Virus

(Ad/CMV-GFP) zur Verfügung. Die eingesetzten Viren mit entsprechendem Virus-Titer sind in Tabelle 10 aufgelistet.

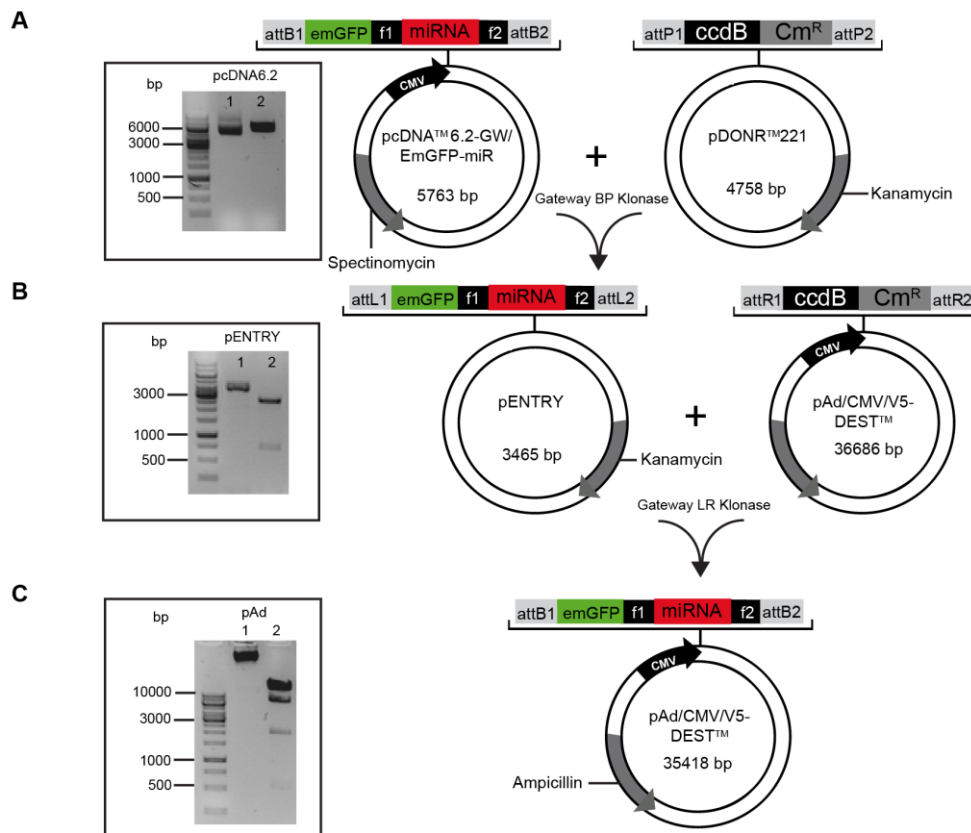


Abb. 33: Die Klonierung der miRNA-kodierenden DNA in die adenovirale DNA pAd/CMV/EmGFP-miR™. (A) Für die BP-Reaktion musste zunächst das Plasmid pcDNA6.2-miRNA über einen Restriktionsverdau mit Eco521 linearisiert werden. Das Gelbild zeigt die unbehandelte Plasmid-DNA (1) und die mit Eco521 behandelte DNA (2). Die unbehandelte DNA hinterließ eine Spur auf dem Gel und wanderte im Vergleich zur linearisierten DNA etwas schneller im Gel vorwärts. Die Expressionskassette bestehend aus den Erkennungsstellen attB1 und -2, der miRNA- und emGFP-kodierenden DNA und den miRNA-flankierenden Sequenzen (f1 und f2), wurde über eine BP-Gateway-Reaktion aus dem pcDNA6.2-miRNA in den pDONR™221 kloniert. (B) Aus der BP-Reaktion entsteht das pENTRY-Plasmid, in welchem die Expressionkassette durch attL-Erkennungsstellen eingegrenzt wird und welcher über das Antibiotikum Kanamycin selektiert werden konnte. Über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym PvuI konnte der Einbau der Expressionkassette überprüft werden. Die dadurch entstandenen DNA-Banden wanderten im elektrischen Feld in etwa auf die Höhe von 900 und 2660 bp (2). (C) In einer LR-Reaktion wurde die Expressionkassette im pENTRY durch den Einsatz von einer LR-Klonase mit der durch die attR-Erkennungsstellen flankierten DNA ausgetauscht. Das entstandene Plasmid konnte über den Ampicillin Zusatz im Nährmedium selektiert werden. Die Reaktion wurde über einen Restriktionsverdau mit EcoRI überprüft. Die unbehandelte Kontroll-DNA ist mit 36686 bp recht groß und wanderte nur ein kurzes Stück aus der Geltasche heraus (1) Die behandelte DNA trennte sich in mehrere Banden auf, welche ungefähr auf die erwarteten Höhen von 27396, 6772, 1994 und 526 bp wanderten und damit eine erfolgreiche Klonierung anzeigten (2).

3.3.3 Der Adenovirus infiziert nur Gliazellen

Der Adenovirus mit enthaltendem pAd-miRNA-Kcnj11_52 (Ad/CMV-Kcnj11_52) oder dem Kontroll-Plasmid (Ad/CMV-GFP) wurde über drei verschiedenen Methoden auf bzw. in die organotypischen Schnittkulturen gebracht. Eine Methode war die sich

wiederholende Applikation eines 10 µl-Tropfens auf die Kultur, eine andere die Inkubation des OHSC in einer Viruslösung direkt nach der Präparation und die letzte Methode war eine lokale Mikroinjektion des Virus in den DG. Bereits 12 Stunden nach der Infektion konnte eine GFP-Expression erkannt werden. Die OHSC wurden ca. drei bis sieben Tage nach der Infektion für ein Patch-Clamp-Experiment und/oder für die Immunohistochemie weiterverwendet. Im Patch-Clamp-Experiment konnten die GFP-exprimierenden Zellen über ein inverses Mikroskop und eine Kaltlichtlampe sichtbar gemacht werden (Abb. 34). Die OHSC zeigten eine intensive, großflächige GFP-Expression, die über die gesamte Kultur verteilt auftrat.

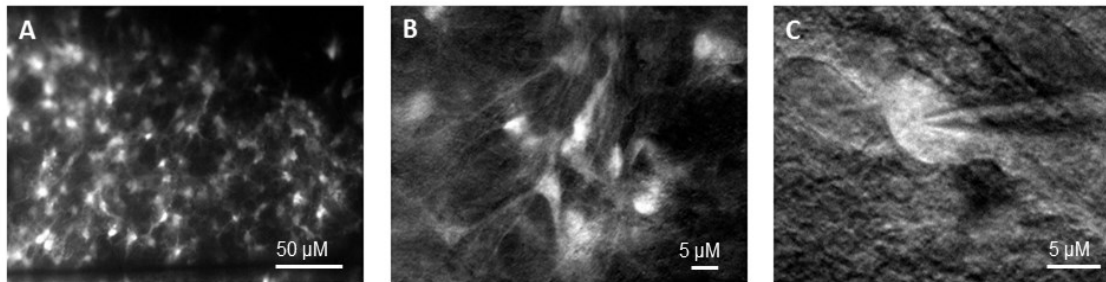


Abb. 34: Infizierte Zellen im OHSC unter einem inversen Mikroskop zur Untersuchung der Elektrophysiologie. (A) Unter Anregung der GFP-exprimierenden Zellen konnten die infizierten Zellen erkannt werden. Über die OHSC verteilt emittierten Zellen ein starkes Fluoreszenzsignal. (B) Infizierte Zellen im GC-Band. Unter dem Patch-Clamp-Mikroskop konnten die fluoreszierenden Zellen nicht mit Sicherheit einem Zelltyp zugeordnet werden. (C) Eine Patchpipette an einer fluoreszierenden Zelle im GC-Band: Um die fluoreszierenden Zellen anhand ihrer Elektrophysiologie zu identifizieren, wurden ihre Eigenschaften mit einer Patch-Clamp-Elektrode gemessen.

Die fluoreszierenden Zellen wurden im Bereich des GC-Bandes des DG ausgewählt und die Zelle unter wechselnder Ausleuchtung über das Durchlicht und Fluoreszenz-Anregung angepatcht. Die GFP-positiven Zellen konnten anhand der gemessenen Eigenschaften in zwei Populationen eingeteilt werden. Zum einen wurden Zellen mit einem Eingangswiderstand über 200 MΩ gemessen, die im Mittel einen R_{in} von $520 \text{ M}\Omega \pm 120$ vorwiesen und ein Membranpotential von $-71 \pm 5 \text{ mV}$ ($n = 8$) besaßen und zum anderen Zellen mit einem sehr niedrigen R_{in} von $49 \pm 7 \text{ M}\Omega$, die ein ähnliches Membranpotential von $-76 \pm 4 \text{ mV}$ zeigten ($n = 11$). Jedoch konnten bei keiner dieser Zellen Aktionspotentiale oder ein sAHP-Strom gemessen werden, was gegen die Messung von GCs sprechen würde. Um auszuschließen, dass die Expression der Virus-DNA diese Beobachtung auslöst, wurden die OHSC nach der Patch-Clamp-Messung einer immunohistochemischen Färbung der GCs bzw. Neurone mit Fluoreszenzfarbstoffen unterzogen. Das gleichzeitige Auftreten des Fluoreszenz-Signals von Neuronen (NeuN) und der GFP-Expression, welche eine Virus-infizierte Zelle identifizierte, tauchte bei keiner der angewandten Infektionsmethoden auf. Die OHSC, die über einen Tropfen infiziert wurden, zeigten eine großflächige Virusinfektion über das GFP-Signal (Abb. 35 A). Jedoch waren starke Aussparungen des GFP-Signals in dem Bereich in dem Neurone vermehrt auftreten, (GC- und PC-Band) zu erkennen. Die über eine Viruslösung infizierten OHSC schienen zunächst eine gleichmäßige GFP-Expression über die gesamte Kultur verteilt, zu besitzen. Bei genauerer Betrachtung der

Neuronenbänder wurde jedoch auch in diesem Fall deutlich, dass die GFP-Expression nicht in den fluoreszenzmarkierten Neuronen auftrat (Abb. 35 B).

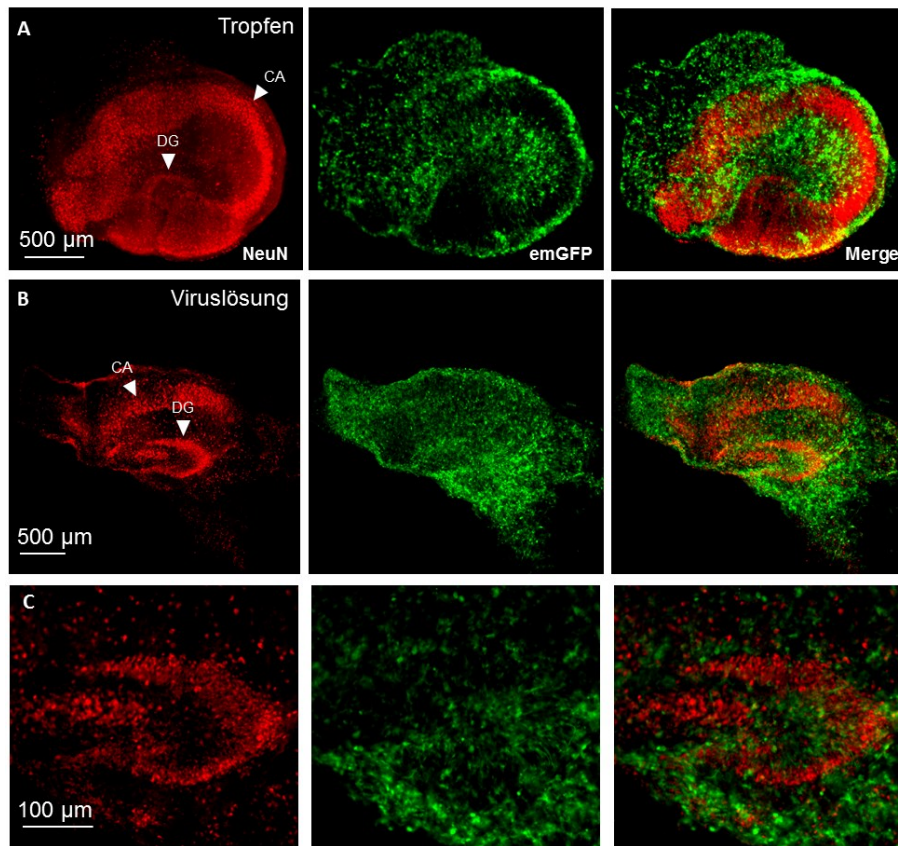


Abb. 35: Die Infektion von Zellen der OHSC mit dem Adenovirus Ad/CMV-GFP über die Tropfen-Methode und die Inkubation in einer Viruslösung. Die Neurone in infizierten OHSC wurden immunohistochemisch mit Fluoreszenz-gebundenen Antikörpern markiert und konnten über eine Anregung mit Licht der Wellenlänge ~650 nm dargestellt werden (NeuN). Die infizierten Neurone exprimierten emGFP und konnten über eine Anregung mit Licht der Wellenlänge ~480 nm sichtbar gemacht werden (emGFP). Die Überlagerung des NeuN- und emGFP-Kanals würde die Infektion von Neuronen über eine Gelbfärbung der betroffenen Neurone anzeigen. (A) Die Infektion von Zellen in OHSC über die wiederholte Applikation eines Tropfens aus Viruslösung auf die Kulturen. Die Antikörpermarkierung mit NeuN zeigt das Körnerzellband und das CA-Band. Die infizierten Zellen im OHSC konnten über eine Anregung von GFP sichtbar gemacht werden und zeigten eine großflächige Infektion von Zellen im Hippocampus und EC. Die Überlagerung der beiden Kanäle (*Merge*) zeigt, dass im Bereich der Neurone Aussparungen von infizierten Zellen vorzufinden sind. Wohingegen in den Bereichen, in welchen eher Gliazellen zu vermuten sind, eine starke emGFP-Expression erkennbar ist. (B) Die Inkubation des OHSC in einer Viruslösung direkt nach der Präparation. Die infizierte OHSC in der Übersicht (B) und die nähere Betrachtung des GC-Bandes (C). Die NeuN-Markierung zeigt, das GC- und CA-Band. Die emGFP-exprimierenden Zellen befinden sich großflächig über die Kultur verteilt. Die Überlagerung zeigt dennoch, dass die NeuN-markierten Neurone keine emGFP Expression vorweisen.

In einem weiteren Experiment wurde die Mikroinjektion der Adenoviren in den DG der OHSC getestet (Abb. 36). Dabei wurde der Virus über eine Glaspipette, die an einem manuell-verstellbaren Manipulator befestigt war, lokal in den DG injiziert. Es zeigten wieder viele Zellen ein GFP-Signal, besonders stark war dieses im Bereich des GC-Bandes. Bei näherer Betrachtung wurde deutlich, dass sich vertikal orientierte, radiale Fasern der GFP-exprimierenden Zellen zwischen den GCs her winden (Abb. 36). GCs mit GFP-Signal konnten wieder nicht ausfindig gemacht werden. In jedem Fall war also

kein ausreichender Gentransfer in GCs erreicht worden, der für weitere elektrophysiologische Untersuchungen ausgereicht hätte.

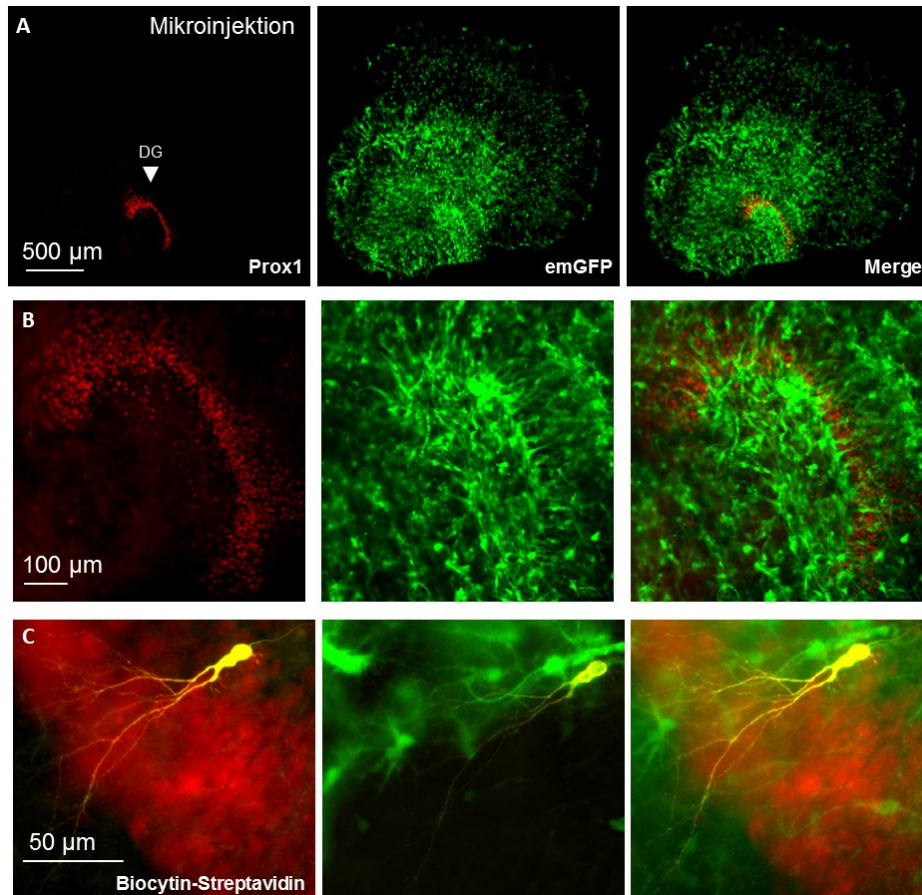


Abb. 36: Die Mikroinjektion des Adenovirus Ad/CMV-GFP in das GC-Band des *Gyrus Dentatus*. Die GCs wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern über die GC-spezifische Bindung an Prox1 sichtbar gemacht (Prox1). Die infizierten Zellen sind an der Expression von emGFP in den Zellen des OHSCs erkennbar (emGFP). Die Übereinanderlagerung der beiden Kanäle von Prox1 und emGFP würde eine Infizierung von Prox1-Neuronen, also GCs, über eine Gelbfärbung dieser sichtbar machen. (A) Das GC-Band in der OHSC-Übersicht. Hier wird eine großflächige Infizierung von Zellen im OHSC deutlich. (B) Das GC-Band im näheren Fokus. Bei näherer Betrachtung wird deutlich, dass sich die GFP-exprimierenden Zellen zwischen den Körnerzellen herwinden. (C) Eine mit Biocytin gefüllte Zelle, die zuvor im Patch-Clamp-Experiment gemessen wurde. Über die Bindung des Fluoreszenz-markierten Streptavidin an Biocytin kann die Zelle im Nachhinein über eine Anregung mit einer maximalen Wellenlänge von 573 nm sichtbar gemacht werden. Die Übereinanderlagerung der verschiedenen Leica Kanäle für Prox1, emGFP und Streptavidin zeigt, dass eine GFP-exprimierende Zelle gepatcht wurde, die keine reife GC war.

4 Diskussion

In dem ersten Teil dieser Arbeit sollte die langsame Nachhyperpolarisierung in hippocampalen Körnerzellen pharmakologisch und elektrophysiologisch charakterisiert und die Beteiligung von bestimmten Ionenkanälen an dem KaliumEinstrom ermittelt werden.

4.1 Der sAHP-Strom von Körnerzellen

Körnerzellen des *Gyrus dentatus* spielen unter anderem in der Hippocampus-abhängigen Gedächtniskonsolidierung, der reduzierten und effektiven Kodierung von Informationen und in der Temporallappenepilepsie eine wichtige Rolle. Deshalb ist es unabdingbar das elektrophysiologische Verhalten von GCs und dessen molekulare Grundlagen besser zu verstehen. Welchen Stellenwert der sAHP-Strom in der Etablierung des intrinsischen Feuerverhaltens der GCs einnimmt, soll in den nächsten Kapiteln herausgestellt werden.

4.1.1 Körnerzellen des *Gyrus dentatus* sind „*burster*“ und zeigen einen prominenten sAHP-Strom

In Studien und Fachbüchern, welche den elektrophysiologischen Phänotyp von GCs im DG zeigen und benennen, wird die Aktionspotentialantwort auf eine lange Stimulation meistens als tonisch mit mehr oder weniger starker Abnahme der AP-Frequenz (*Spike frequency adaptation*, SFA) beschrieben, aber nie als „Alles-oder-Nichts“-phasisch (Andersen et al., 2007; Gupta et al., 2012; Nenov et al., 2015; Podlogar & Dietrich, 2006; Scharfman, 1992). In dieser Arbeit sollte diese Beobachtung im *current clamp*-Modus und unter *perforated Patch-Clamp*-Bedingungen überprüft werden.

Körnerzellen sind „Alles-oder-Nichts“-*burster*. Die große Mehrheit der GCs feuerte nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip, bereits bei Erreichen des Schwellenwertes und darüber hinaus, kurze Salven von APs (*bursts*, Kapitel 2.1.6.1), auf welche eine lange Aktivitätspause folgte. Mit zunehmender injizierter Stromstärke nahm die AP-Anzahl in dem *burst* in einigen Fällen zu, in anderen Fällen blieb sie konstant. Es konnten ebenso einige GCs gemessen werden, die von Anfang an nur mit einem einzelnen AP antworteten und dieses Verhalten selbst bei starken Strompulsen beibehielten. Nur sehr wenige GCs zeigten einen stark adaptierenden Phänotyp, d.h. es traten zunächst noch vereinzelte APs in größeren Abständen auf, die sich mit Erhöhung der Stromstärke reduzierten (SFA) und letztendlich oft zu einem *burst*-Phänotyp führten (Abb. 14 B). Eine vernachlässigbare Anzahl an GCs adaptierten sehr schwach (Abb. 14 C). Dieses Ergebnis stimmt mit kürzlich publizierten *in vivo* Patch-Clamp Experimenten überein, welche zeigten, dass GCs bevorzugt AP-*bursts* feuern (Pernia-Andrade & Jonas, 2014). Bei *in vivo*-Experimenten kann man jedoch nicht genau sagen, ob die Gruppen-AP-Entladungen eher synaptisch (extrinsisch) oder intrinsisch veranlasst sind. Die hier beschriebenen Experimente belegen klar, dass GCs intrinsisch *bursting* stark präferieren – zumindest

wenn der sAHP-Strom nicht inhibiert ist. Der Zusammenhang zwischen AP-Entladungs-Phänotyp und den sAHP-Stromamplituden wurde auch im *voltage clamp*-Modus untersucht (Kapitel 3.1.3). Im Vergleich zeigte sich bei den wenigen Zellen mit adaptierenden Phänotyp ein merklich kleinerer sAHP-Strom als bei Zellen mit „Alles-oder-Nichts“-*burst*-Phänotyp. Das Ergebnis spricht dafür, dass der funktionelle Phänotyp von GCs stark von der Ausprägung der sAHP-Stromamplitude abhängig ist.

Die sAHP-Messtechnik und der funktionelle Phänotyp. Da der sAHP-Strom hochsensibel auf eine Änderung der intrazellulären Zusammensetzung reagiert, kann die Verdünnung dieser durch die Etablierung einer *whole cell*-Messung der Grund dafür sein, dass in vorherigen Studien kein *burst*-Phänotyp beschrieben wurde (Nenov et al., 2015). Es war bereits früh bekannt, dass der Austausch zwischen Zell- und Patchpipettenlösung während einer *whole cell*-Messung die elektrophysiologischen Charakteristika des Neurons verändern kann (Bean, 1992; Kay, 1992). Darunter fällt auch die Reduktion des sAHP-Stroms (Villalobos et al., 2011; Zhang et al., 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Hauptanion in der Patchpipettenlösung einen Effekt auf die Elektrophysiologie von unterschiedlichen Neuronen hat (McKillen et al., 1994; Nakajima et al., 1992; Schwindt et al., 1992; Spigelman et al., 1992). Es wurde beispielsweise eine inhibitorische Wirkung von Kaliumglukonat auf mehrere physiologische Ionenströme, unter anderem auch das sAHP beschrieben (Velumian et al., 1997). Somit könnten die Verwendung von unterschiedlichen Messlösungen und -techniken die widersprüchlichen Beobachtungen des funktionellen Phänotyps von GCs erklären (Staley et al., 1992; van Praag et al., 2002; Yarishkin et al., 2014). Diese Annahme wird durch Beobachtungen von Velumian et al. bestärkt, die während einer Messung an CA-Neuronen mit einer Kaliumglukonat-Pipettenlösung, eine starke, reversible Reduktion des sAHP-Stroms und damit verbunden eine Transformation des *burst*-Verhaltens in einen schwachen SFA-Phänotyp feststellten (Velumian et al., 1997).

Zhang et al. zeigten im Jahr 1994, dass der sAHP-Strom unter einer auf Methylsulfonat basierenden Pipettenlösung gut erhalten werden kann (Zhang et al., 1994). Eine ähnliche Beobachtung konnte in *whole cell*-Studien gemacht werden, in welchen ein kurzer Sauerstoffmangel nur in mit KMeSO₄-dialysierten Neuronen einen prominenten Kaliumstrom auslöste, nicht aber in Neuronen, welche mit Kaliumglukonat oder Kaliumchlorid gemessen wurden (Belousov et al., 1995; Chung et al., 1998; Zhang & Krnjevic, 1993). Da die Verwendung von Methylsulfonat im Rahmen der vorliegenden Arbeit aber dennoch zu einem, zwar im Vergleich zur Verwendung von Kaliumglukonat langsameren, aber stetigem *rundown* führte, kam das Antibiotikum Gramicidin zum Einsatz. Mit der Kombination von Kaliummethylsulfonat und Gramicidin konnten hier über lange Zeiträume stabile sAHP-Strommessungen an GCs durchgeführt werden und eine klare Mehrheit an „Alles-oder-Nichts“-*burst* Feuertypen beobachtet werden. Warum allerdings eine Studie mit *perforated*-Messungen (unter Verwendung von Kaliumglukonat) von GCs sehr tonische Entladungsmuster zeigt (Podlogar & Dietrich, 2006), ist nicht ganz klar. In unserer Arbeitsgruppe (Kirchheim et al., 2013) sind *perforated*-Messungen mit Kaliumglukonat wie von Podlogar verwendet oft spontan in den *whole cell*-Modus durchgebrochen, was leicht unbemerkt bleiben kann (Abb. 13).

Vor allem für die anspruchsvollen und zeitaufwendigen Messungen des sAHP-Stroms und die Untersuchung der Wirkung verschiedener pharmakologischer Substanzen auf den sAHP-Strom, sind stabile Messungen besonders wichtig. Abweichungen in der sAHP-Stromamplitudengröße könnten sonst schnell als pharmakologische Wirkung fehlinterpretiert werden. Insgesamt zeigen die zuvor beschriebenen Beobachtungen, dass die Aktivierung des sAHP-Stroms ein sehr labiler Prozess ist und die Wahl der Patchpipettenlösung, sowie die Messmethode Einfluss auf den elektrophysiologisch definierten Phänotyp nehmen. Ein Hauptgrund für den *rundown* im *whole cell*-Modus dürfte die indirekte Kopplung zwischen Calciumeinstrom und Kaliumausstrom sein (Zhang et al., 1995; Zhang et al., 1994), aber auch Veränderungen anderer Verhältnisse im intrazellulären Milieu (siehe Kapitel 4.7).

Funktion des *burst*-Verhaltens. Mit dem *burst*-Phänotyp sind GCs in der Lage eine effektive Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt auszulösen und damit die Wahrscheinlichkeit in einem CA3-Neuron ein AP auszulösen, zu erhöhen (Henze et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass hippocampale Neurone mit einem *burst*-Phänotyp LTP viel effizienter induzieren können als Neurone mit regulärem Feuerverhalten (Kampa et al., 2006; Lisman, 1997; Paulsen & Sejnowski, 2000; Pike et al., 1999). Die beiden gefundenen Aktivitätsmuster lassen vermuten, dass den wenigen GCs mit SFA eventuell andere Aufgaben in der hippocampalen Prozessierung zukommen als denen mit *burst*-Verhalten oder aber dass die GCs abhängig von ihrem Reifestadium unterschiedliche Aktivitätsmuster aufzeigen (Nakashiba et al., 2012; Nenov et al., 2015). Ein abnormales *burst*-Verhalten von Neuronen konnte zusätzlich mit der Initiierung und Verstärkung von epileptischer Aktivität in Zusammenhang gebracht werden (Alger & Nicoll, 1980; Traub & Wong, 1982). Der *burst*-Phänotyp spielt damit eine entscheidende Rolle in dem Lernprozess und der Gedächtniskonsolidierung und hat einen Einfluss auf die Verbreitung von epileptischer Aktivität in den Hippocampus.

4.1.2 Die Elektrophysiologie von DG-Körnerzellen im Kainat-Modell

Da in einigen Studien eine abnorme Regulation des sAHPs mit der Epileptogenese in Verbindung gebracht wurde (Behr et al., 2000; Fernandez de Sevilla et al., 2006; Martin et al., 2001; McCormick & Contreras, 2001), sollte in dieser Arbeit der sAHP-Strom von epileptischen GCs im Kontext einer Temporallappenepilepsie (TLE) untersucht werden. Dafür wurde hier das Kainat (KA)-Modell verwendet. Bei diesem Modell sind die Veränderungen in der Morphologie der Zellen und der Anatomie des Hippocampus als Folge der epileptischen Anfälle konsistent mit den pathologischen Veränderungen bei TLE-Patienten (Heinrich et al., 2006; Mello et al., 1992; Sharma et al., 2007).

Der intrinsische sAHP-Strom von Kainat-Körnerzellen liegt unverändert vor. Die Untersuchung der intrinsischen Eigenschaften von KA-GCs mit der *perforated* Patch-Clamp-Technik und unter CTRL-Bedingungen zeigte keinen veränderten sAHP-Strom. Ohne synaptische Isolierung und Blockade der bekannten Natrium- und Kaliumströme, wie es der Fall in der ACSF-Lösung war, lag jedoch ein im Mittel um ca. 40% reduzierter sAHP-Strom vor. Die Ursache dieses Unterschiedes wurde in der vorliegenden Arbeit

nicht weiter untersucht. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte ein verminderten Einstrom von Calcium in die GCs des Kainat-Modells sein, da unter CTRL-Bedingungen BK-Kanäle, die das AP verkürzen (Faber & Sah, 2002), blockiert waren. Es konnte in diesem Datensatz jedoch keine signifikant veränderte AP-Breite von KA-GCs im Vergleich zu naiven GCs gefunden werden, welche einen reduzierten Calciumeinstrom erklären könnte (Tabelle 14). Dieser Befund wurde auch in einer Studie von Melyan et al. erhoben, die ebenso eine sAHP-Strom-Inhibition via Aktivierung von Kainatrezeptoren beschreibt, welche nicht mit einer Änderung des Calciumeinstroms einherging (Melyan et al., 2002). Eine andere Erklärung für den reduzierten sAHP-Strom unter ACSF-Bedingung wäre eine Involvement von metabotropen KA-Rezeptoren (KARs), welche an den Proteinkinase C-Signalweg gekoppelt sind. Zwar waren die KARs lange Zeit als ionotrope Rezeptoren an der Prä- und Postsynapse bekannt, jedoch konnte 1998 das erste Mal ebenso eine metabotrope Aktion nachgewiesen werden (Rodriguez-Moreno & Lerma, 1998). Dass einige der Funktionen von KARs unabhängig von der ionotropen Aktivität und einer synaptischen Stimulation stattfinden, ist ebenso in der Studie von Melyan et al., 2002 beschrieben. Die Reduktion des sAHPs von PCs während der Umspülung der Zellen mit Kainat konnte in der Studie von Melyan et al. durch einen G-Proteinblocker und einen PKC-Inhibitor verhindert werden und trat ohne ionotrope Aktivität oder Netzwerkaktivität auf. Die Aktivierung der metabotropen Kainatrezeptoren führte dabei zu einem langanhaltenden Effekt auf das sAHP. Die Inhibition des sAHPs konnte ebenso durch die Applikation des KAR-Blockers CNQX aufgehalten werden, was die Involvement von KARs bestärkt (Melyan et al., 2002). In einer anderen Studie werden die KAR-Untereinheiten KA2 und GluR6 für die Inhibition des sAHP-Stroms als Reaktion auf Kainatkonzentrationen im nanomolar-Bereich, verantwortlich gemacht (Fisahn et al., 2005; Mülle et al., 1998). Biochemische Analysen zeigten, dass KA2 mit dem $G\alpha(q/11)$ -Protein interagiert. Dass der sAHP-Strom über die $G\alpha(q/11)$ -Signalkaskade moduliert wird, war zuvor bereits bekannt (Ruiz et al., 2005). Ob die Aktivierung von KARs im chronischen KA-Modell auch die Ursache für einen verminderten sAHP-Strom sind und wie der langanhaltende Effekt zustande kommt, müsste mit weiteren Experimenten ermittelt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die intrinsischen Mechanismen in den GCs, welche den sAHP-Strom bedingen oder beeinflussen, in dem KA-Modell unverändert sind, wobei eine Regulation des sAHP-Stroms von GCs via synaptischer Prozesse im chronischen KA-Modell scheinbar möglich ist.

Die Körnerzellen in der TLE. Ein möglicher verminderter sAHP-Strom würde eher eine pro-convulsive Wirkung haben, welche in Kontrast zu den eher anti-convulsiven, intrinsischen Eigenschaften von KA-GCs stehen würde, die in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.4) und in anderen Studien ermittelt wurden (Kirchheim et al., 2013; Stegen et al., 2012; Stegen et al., 2009; Young et al., 2009). Zu den gefundenen, veränderten Eigenschaften von KA-GCs zählt ein herabgesetzter Eingangswiderstand, eine niedrigere Membranzeitkonstante, sowie eine erhöhte Rheobase und ein erhöhter Schwellenwert (siehe Kapitel 3.1.4). Außerdem antworteten die epileptischen GCs mit einer Verzögerung der AP-Generierung auf einen Strompuls, welche F. Kirchheim im Jahr 2013 einem durch Kv1.1-Kanal generierten „Delay“-Strom zuschrieb (Kirchheim et al.,

2013). Diese passiven Eigenschaften von KA-GCs im TLE-Tiermodell, sowie in operativ entfernten Hippocampi von TLE-Patienten lassen also eher auf eine herabgesetzte Erregbarkeit schließen. Diese geht vor allem auf eine Verminderung des Eingangswiderstands zurück. Der veränderte Eingangswiderstand resultiert aus der erhöhten Expression von einwärts-gleichgerichteten Kaliumkanälen (K_{ir}) der Familie $K_{ir}2.1-4$ und 2-Poren-Domänen-Kaliumkanälen der Familie $K_{2P1.1}$ und $K_{2P6.1}$ (Stegen et al., 2012; Stegen et al., 2009; Young et al., 2009), welche als sogenannte *leak*-Kanäle bekannt sind, da sie beim Ruhemembranpotential geöffnet sind. Damit einhergehend zeigen die erhöhte Rheobase und der Schwellenwert, dass im Vergleich zu Kontroll-GCs APs in KA-GCs erst durch stärkere Reize ausgelöst werden können. Die veränderte Elektrophysiologie, die ausschließlich in Tiermodellen und hippocampalen Humangewebe mit hippocampaler Sklerose (HS) und in beiden Fällen nur im HS-Fokus beobachtet wurde, stimmt auch mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein, welche die Körnerzelldispersion (GCD), die Moosfasersprossung und eine stark veränderte Genexpression ebenfalls nur im DG von TLE-Modellen mit HS vorfanden. In den Studien mit TLE-Modellen ohne HS hingegen, konnten keine Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von GCs gemessen werden (Dietrich et al., 2005; Isokawa & Fried, 1996; Molnar & Nadler, 1999; Okazaki et al., 1999; Scharfman et al., 2003). Auf synaptischer Ebene tragen das Fehlen von rekurrenten exzitatorischen Synapsen mit benachbarten GCs und die Präsenz von inhibitorischen Synapsen von Interneuronen auf die GCs zur verminderten Erregungsweiterleitung bei. Im epileptischen Gehirn scheint die Inhibition von GCs durch Interneurone auch trotz Degeneration dieser im Hilus und der Molekularschicht, aufrecht erhalten zu bleiben (Magloczky & Freund, 2005; Wittner et al., 2001). Hinzukommend zeigen GCs in TLE-Patienten eine erhöhte Expression von GABA-Rezeptoren (Bouilleret et al., 2000; Loup et al., 2000; Nusser et al., 1998; Schwarzer et al., 1997), was ebenfalls die herabgesetzte Erregbarkeit von KA-GCs unterstreicht. Die GCs sind also wahrscheinlich in der Lage, ihre intrinsischen Eigenschaften an eine Übererregung anzupassen und damit ihre Überlebenschance unter epileptischen Bedingungen zu erhöhen und eine Weiterleitung von pathologisch erhöhtem Input zu verhindern (Covolan et al., 2000; Stegen et al., 2012). Der hier ermittelte unveränderte, intrinsische sAHP-Strom in KA-GCs passt ebenso zu den oben genannten anti-konvulsiven Eigenschaften und ist aufgrund der kontrollierten Messbedingungen höher zu bewerten als der in der ACSF-Lösung ermittelte sAHP-Strom.

Aufgrund des Fehlens von exzitatorischen Synapsen auf andere GCs und die starke Inhibition durch Interneurone kam zuvor bereits die Hypothese auf, dass die GCs als Barriere für die Weiterleitung von epileptischer Aktivität in den Hippocampus dienen (Heinemann et al., 1992; Vida, 2009). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass erst stärkere und reguläre, epileptische Entladungen, welche bereits zu wiederkehrenden, einzelnen Anfällen führen, zu einem Übergang der Aktivität in den Hippocampus führen (Collins et al., 1983). Scheinbar ist hier eine Schwelle erreicht, bei welcher die Körnerzellen der Überaktivität nicht mehr standhalten können. Nach dieser Theorie können GCs also im Anfangsstadium einer Epilepsie auftretende, übererregende Aktivitäten ausbremsen, wobei sie jedoch langanhaltenden Eingang exzessiver Aktivität

nicht mehr effektiv aufhalten können. Das liegt vor allem daran, dass die damit einhergehende starke Glutamat-Freisetzung den sAHP-Strom vermindert (Martin et al., 2001) und damit eine erhöhte *burst*-Frequenz auslöst (Fernandez de Sevilla et al., 2006). Damit können die GCs die einkommenden Aktivitäten nicht mehr effektiv ausbremsen und den Übergang von epileptischen Aktivitäten in den Hippocampus nicht mehr verhindern (Chamberlin & Dingledine, 1989).

4.2 Der sAHP-Strom ist ein Calcium-abhängiger Kaliumstrom

Der sAHP-Strom wurde in vielen Studien als ein Calcium-abhängiger Kaliumstrom beschrieben (siehe Kapitel 1.3.1). Auch in dieser Arbeit konnte diese Zuordnung für GCs bestätigt werden (Abb. 37). Die Calciumabhängigkeit zeigte sich unter anderem durch den vollständigen Block des sAHP-Stroms mit der Applikation von Nickel. Außerdem konnte durch eine photolytische Calciumfreisetzung in der Zelle ein langsamer Hyperpolarisationsstrom ausgelöst werden, deren Kinetik dem durch einen Spannungspuls ausgelösten sAHP-Strom ähnelt (Kapitel 3.2.2.4). Sah und Clements konnten diesen ebenfalls durch Calcium-Uncaging auslösen und zeigten, dass der Apamin-insensitive Teil des Einstroms durch Serotonin und Carbachol reduziert werden konnte, was die Vermutung bestärkt, dass der Strom durch sAHP-Kanäle generiert wird (Sah & Clements, 1999). In Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch die Blockade aller bekannten Kalium- und Natriumkanäle mit der CTRL-Lösung während des 100 ms-langen Spannungspulses im sAHP-Protokoll ein starker prominenter Calciumeinstrom ausgelöst (Abb. 11 A), der höchstwahrscheinlich maßgeblich zu der Aktivierung des sAHP-Stroms beitrug.

Die Calciumquelle für die Aktivierung des sAHP-Stroms. Welche Calciumquellen bei der physiologischen Aktivierung des sAHP-Stroms eine Rolle spielen, wurde nur ansatzweise getestet und soll im Folgenden diskutiert werden. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann aus dem Calciumstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle (McCleskey et al., 1986; Simms & Zamponi, 2014) und/oder aus der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern resultieren (Strigrow & Ehrlich, 1996). Van de Vrede beschrieb 2007, dass die Blockade der Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum den sAHP-Strom reduzierte (van de Vrede et al., 2007). Dieser Befund konnte hier für DG-GCs jedoch nicht bestätigt werden, da der sAHP-Strom eine Blockade der Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum gut überstand. Eher scheint der hier unter *perforated* Patch-Clamp-Bedingungen untersuchte sAHP-Strom auf einem Calciumeinstrom durch *high voltage gated* (HVA)-Calciumkanälen, welche durch Cadmium blockiert werden, zu basieren (Kapitel 3.2.2.2). Mehrere Studien beschrieben zuvor eine vielfältige Beteiligung von Calciumkanälen am sAHP-Strom verschiedener Zelltypen. So wurde beinahe jeder bekannte spannungsabhängige Calciumkanal mit dem sAHP in Verbindung gebracht (Aradi & Holmes, 1999; Martinez-Pinna et al., 2000; Moyer et al., 1992; Tanabe et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte bisher nur die Beteiligung des HVA-L-Typ-Calciumkanals ausgeschlossen werden (Kapitel 3.2.2.3). Eine konkrete Aussage,

welche Calciumkanäle am sAHP-Strom von GCs beteiligt sind, kann mit dieser Arbeit also noch nicht getroffen werden. Generell wird vermutet, dass sich das während eines APs einströmende Calcium mit gespeicherten Calcium-Mikrodomänen im Zytoplasma verbindet und nur diese Konzentrationen ausreichen um ein sAHP zu aktivieren (Andrade et al., 2012; Fakler & Adelman, 2008; Neher, 1998).

Kopplung von spezifischen Calciumkanälen und sAHP-Kanal? Da in den meisten Studien nur ein (Tanabe et al., 1998) oder manchmal auch ein festgelegtes Set (Pineda et al., 1998; Shah & Haylett, 2000b) an spezifischen Calciumkanaltypen in dem untersuchten Zelltyp für die sAHP-Kanalaktivierung verantwortlich gemacht wurden, scheint eine strikte Kopplung zwischen spezifischen Calciumkanälen und dem sAHP-Kanal zu existieren. Passend dazu wurden bereits Ionenkanäle gefunden, deren Aktivität auf dem Calciumeinstrom durch spezifische Calciumkanäle beruht (Sah, 1995; Vilchis et al., 2000). Dabei soll diese Kopplung durch die Co-Lokalisierung der Kanäle zustande kommen (Marrion & Tavalin, 1998). Ebenso beschreibt eine Studie von Tanabe den Zusammenhang zwischen der Aktivierung der sAHP-Kanäle (hier werden SK-Kanäle vermutet) durch L-Typ-Calciumkanäle und deren gemeinsamen Lokalisierung in proximalen Dendriten von hippocampalen PCs (Tanabe et al., 1998). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Pharmakologie des sAHP-Stroms in Neuronen des Thalamus von der Calciumquelle des sAHP-Stroms abhängig ist. So konnte UCL2077, ein sAHP-Blocker, den sAHP-Strom blockieren, welcher auf dem Calciumeinstrom durch L-Typ Calciumkanäle basierte, hatte jedoch in denselben Neuronen kaum eine Wirkung auf den sAHP-Strom, welcher durch den Calciumeinstrom durch T-Typ Calciumkanäle aktiviert wird (Zhang et al., 2009b). Eine universelle Zuordnung von spezifischen Calciumkanälen zu dem sAHP verschiedener Zelltypen ist also nicht möglich. Die Beziehungen scheinen eher Zelltyp-spezifisch und von der Lokalisierung der Calciumkanäle in der Nähe eines sAHP-Stromkanals abhängig zu sein. Diese Calciumkanäle steuern dann wahrscheinlich den für die sAHP-Stromgenerierung ausschlagbaren Rest an Calcium zu den gespeicherten Calciumdomänen im Zytosol bei (Zhang et al., 2009b).

Die Kinetik des sAHP-Stroms. Der sAHP-Strom hat seine Peak-Amplitude mehrere hundert Millisekunden nach dem Eintritt von Calcium während der Aktionspotentiale oder kurzer Spannungspulse in die Zelle (Abb. 11). Da die Bindung von Calcium an Reaktionspartner oder die Aufnahme ins endoplasmatischen Retikulum schnell nach dem Eintritt ins Zytoplasma erfolgt, die Kinetik des sAHP jedoch sehr viel langsamer ist (Gerlach et al., 2004; Sah & Clements, 1999), stellt sich die Frage, wie diese Verzögerung zustande kommt. Dafür kommen mehrere Hypothesen in Frage. Zum einen könnte der Bedarf einer weiteren Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern eine Verzögerung hervorrufen (Moore et al., 1998; Sah & McLachlan, 1991), wobei der CICR im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Involvierung in die Aktivierung des sAHP-Stroms bestätigt werden konnte (s.o.). Zum anderen wäre eine Distanz zwischen der Calciumquelle und der sAHP-Kanäle denkbar, die überbrückt werden müsste. Tatsächlich konnte für die GCs des DG und PCs des präfrontalen Cortex eine Beteiligung der Calciumsensoren Hippocalcin und Neurocalcin nachgewiesen werden, welche zytoplasmatisches Calcium binden und zu den sAHP-Kanälen in der Membran

transportieren (Tzingounis et al., 2007; Villalobos & Andrade, 2010). Passend dazu, zeigte eine Studie, dass das sAHP eher durch eine Erhöhung von Calcium im Zytoplasma, als durch eine Calciumerhöhung an der Plasmamembran aktiviert wird (Abel et al., 2004).

Durch die Calciumabhängigkeit ist der sAHP-Strom vulnerabel für Veränderungen von Calciumkonzentrationen in der Zelle. So konnte bereits beobachtet werden, dass Calciumströme mit dem Alter zu nehmen (Thibault & Landfield, 1996; Toescu & Verkhratsky, 2007) und außerdem größere sAHP-Stromamplituden auftreten (Disterhoft & Oh, 2006; Moyer et al., 1992). Es wird vermutet, dass diese im Zusammenhang stehen und damit altersbedingte Lernschwierigkeiten einhergehen (Gant et al., 2015; Luebke & Amatrudo, 2012).

Neuromodulation. Die langsame Nachhyperpolarisierung lässt sich vor allem durch die Eigenschaft, dass die zugrunde liegenden Kaliumströme durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden können, von den anderen beiden AHP-Strömen (fAHP und mAHP) abgrenzen (Pedarzani & Storm, 1993). Der Vorgang wird durch intrazelluläre Botenstoffe vermittelt, welche durch eine Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) via Neurotransmitterbindung freigesetzt werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Aktivität von Adenylatzyklen auf den sAHP-Strom untersucht. Die Adenylatzyklase ist ein an die GPCRs gekoppeltes, membranständiges Enzym, welches bei Aktivierung ATP zu cAMP umsetzt. cAMP übernimmt als Botenstoff (*second messenger*) vielfältige Aufgaben, wie zum Beispiel die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche wiederum Kanäle und Enzyme phosphoryliert (Yan et al., 2016). Passend zu diesen vorhergehenden Studien, führte der Einsatz von Forskolin in Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit, zu einem Abfall des sAHP-Stroms und zeigt damit eine Sensitivität gegenüber der Aktivität des Enzyms. Physiologisch inhibieren vor allem Monoamine wie Serotonin und die Catecholamine Noradrenalin und Dopamin, welche über eine Bindung an G-Proteine mit anschließender Aktivierung der PKA und weiterer Signalwege agieren (Molinoﬀ, 1984), den sAHP-Strom (Goaillard & Vincent, 2002; Madison & Nicoll, 1986; Pedarzani & Storm, 1993). Die Sensitivität des sAHP-Kanals gegenüber Neurotransmittern und Hormonen erlaubt also starke Veränderungen der sAHP-Stromausprägung und damit extreme Variationen im Aktivitätsverhalten der Neurone. Damit kann die Zellaktivität zum Beispiel an das physiologische Stressniveau angepasst werden.

BK- und SK-Kanäle nehmen indirekten Einfluss auf die Ausprägung des sAHP-Stroms. Aufgrund der Calciumabhängigkeit würde eine Involvierung von BK- oder Apamin-sensitiven SK-Kanälen in den sAHP-Strom nahe liegen. Die direkte Beteiligung an dem, im vc-Modus gemessenen, sAHP-Strom konnte jedoch über die CTRL-Lösung ausgeschlossen werden, welche den BK-Kanalblocker TEA und SK-Kanalblocker Apamin enthielt und eher eine Zunahme als eine Abnahme des sAHP-Stroms auslöste (Abb. 7, Abb. 12). Die Zunahme der sAHP-Stromamplitude könnte auf die Blockierung des BK-Kanals und damit des fAHPs zurückzuführen sein, welche zu einer starken Ausdehnung des APs führt (Abb. 11 B) (Sah & Faber, 2002; Vergara et al., 1998). Diese Ausdehnung hat einen erhöhten Calciumeinstrom zur Folge, welcher wiederum einen

verstärkten sAHP-Strom auslöst (Kamal et al., 2003; Kimm et al., 2015). Brenner et al., 2005 zeigten, dass die beta-4 Untereinheit (UE) der BK-Kanäle eine entscheidende Rolle in der Regulation des intrinsischen Feuerverhaltens spielt. Eine Funktion der UE ist es den BK-Kanal an der Beteiligung an der Membranrepolarisation zu hindern und dadurch die Dauer von APs zu verlängern, was wiederum zu einer reduzierten Erregbarkeit der GCs führt und den Hippocampus vor eingehenden anfallsartigen Aktivitäten aus dem Temporallappen schützt (Brenner et al., 2005). Ebenso haben SK-Kanäle als Vermittler des mAHPs einen indirekten, regulatorischen Effekt auf den sAHP-Strom, da sie über einen negativen Feedback-Mechanismus die Aktionspotentialfrequenz und damit den Calciueinstrom beeinflussen (Mateos-Aparicio et al., 2014; Pedarzani et al., 2001). Veränderungen in der Zelle, welche die beiden schnelleren AHP-Komponenten betreffen, können somit indirekten Einfluss auf den sAHP-Strom nehmen.

4.3 KCNQ-Kanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

In der Studie von Tzingounis und Kollegen (Tzingounis & Nicoll, 2008) führte die Applikation des KCNQ-Blockers XE991 auf CA1-Pyramidenzellen während einer Standard *whole cell*-Messung zu einer etwa 30%-igen Hemmung des sAHP-Stroms. Diese Beobachtung wurde hier für die DG-GCs mit der *perforated* Patch-Clamp-Methode überprüft. Mit dieser Methode konnte ebenso eine etwa 30%-ige Abnahme des sAHP-Stroms beobachtet werden (Kapitel 3.2.5). Dabei fiel der Effekt umso größer aus, je ausgeprägter der sAHP-Strom zuvor bereits in der CTRL-Lösung war. Das Ergebnis passt auch zu früheren Studien, die das sAHP mit dem Analogon des Fungizids Clotrimazol und Blocker von KCNQ-Kanälen UCL2027 blockieren konnten (Shah et al., 2006; Shah et al., 2001; Soh & Tzingounis, 2010).

Der KCNQ-Aktivator Retigabine. Für ein weiteres Experiment kam der KCNQ-Aktivator Retigabine zum Einsatz. Retigabine verschiebt die Spannungsabhängigkeit von KCNQ 2-5 Kanälen zu mehr hyperpolarisierten Potentialen. Damit erhöht die Substanz die Aktivität von KCNQ-Kanälen am Ruhemembranpotential und nach einer Abfolge von Aktionspotentialen. Mit dieser Wirkung konnte Retigabine bereits erfolgreich in der Epilepsie-Therapie eingesetzt werden, jedoch leider nicht ohne starke Nebenwirkungen (Harris & Murphy, 2011). Retigabine führte zu unterschiedlichen Effekten auf den sAHP-Strom in vorangegangenen Studien. In einer Studie von Tzingounis (Tzingounis & Nicoll, 2008) wird die Wirkung von Retigabine auf den sAHP-Strom so beschrieben, dass die Form des sAHPs dahingehend verändert wird, dass es schwierig wird, die maximale Amplitude zu ermitteln. Kim et al., 2016 beobachteten ebenfalls keine Erhöhung der maximalen sAHP-Stromamplitude mit Retigabine sondern eine beschleunigte Initiierung des sAHP-Stroms nach einem starken Spannungspuls (Kim et al., 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit löste die Applikation des KCNQ-Aktivators keinen signifikanten Effekt auf den sAHP-Strom aus. Insgesamt wurde jedoch eher eine Abnahme als eine Zunahme des sAHP-Stroms beobachtet. Konsistent mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnten Mateos-Aparicio et al., 2014 diesen Effekt ebenfalls in cc-Experimenten sehen und legten die Vermutung an, dass es einen weiteren XE991-

sensitiven aber Retigabine-resistenten Calcium-aktivierten Strom gibt (Mateos-Aparicio et al., 2014). Die Abnahme des sAHP-Stroms unter Retigabine-Einfluss, könnte auf die schwache inhibitorische Wirkung von Retigabine auf spannungsabhängige Calcium- und Natriumkanäle zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Retigabine noch vor der sAHP-Stromauslösung KCNQ-Kanäle blockiert und sie damit vorübergehend inaktiviert (Main et al., 2000; Rundfeldt, 1997).

Die Spannungsabhängigkeit von KCNQ-Kanälen. Auf den ersten Blick erscheint die Beteiligung von KCNQ-Kanälen am sAHP-Strom aufgrund von einigen Kanaleigenschaften fragwürdig. Dazu gehört die Eigenschaft, dass intrazelluläres Calcium eher eine hemmende Wirkung auf die KCNQ-Kanäle hat, als eine aktivierende (Andrade et al., 2012). Dabei findet die Hemmung der KCNQ-Kanäle über einen Calcium/Calmodulin (CaM)-abhängigen Mechanismus statt (Gamper & Shapiro, 2003). Der Calcium-abhängige Mechanismus der sAHP-Aktivierung ist jedoch an neuronale Calcium Sensor (NCS)-Proteine gekoppelt, die Calcium bei viel geringeren Konzentrationen binden, als der CaM-Mechanismus. Dieser Aspekt, sowie die langsame Inaktivierung (Jensen et al., 2007) könnten also trotzdem für eine Involvierung von KCNQ-Kanälen in den sAHP-Strom sprechen (Andrade et al., 2012). Eine weitere Eigenschaft der KCNQ-Kanäle ist die Spannungsabhängigkeit, welche nicht konsistent mit dem Spannungsbereich des sAHPs ist. KCNQ-Kanäle sind in dem beobachteten Spannungsbereich des sAHPs eigentlich nicht geöffnet (Gerlach et al., 2004). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass erhöhte PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)-Konzentrationen den Spannungsaktivierungsbereich von KCNQ-Kanälen in den aktiven Bereich des sAHP verschieben können (Kim et al., 2016). PIP₂ ist ein Phospholipid in der Plasmamembran. In vorangegangenen Studien wurde bereits beobachtet, dass die KCNQ-Kanal Aktivierung von einer bestimmten Konzentration an PIP₂ abhängig ist (Suh et al., 2004; Winks et al., 2005). Außerdem wurde in einer weiteren Studie eine PIP₂-Bindungsstelle zwischen dem Spannungssensor und der Porendomäne gefunden (Zhang et al., 2013). Neuronale Calciumsensoren reagieren wie Hippocalcin auf die erhöhte Ausschüttung von Calcium, binden dieses und transportieren es zu der Plasmamembran (Kapitel 4.2). Es wird angenommen, dass diese Reaktion zu einer Erhöhung von PIP₂ führt, welches wiederum die sAHP-Kanäle aktiviert. Passend dazu zeigten Villalobos et al. im Jahr 2011, dass eine verstärkte Synthese von PIP-5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-Kinase), einem Enzym das PIP₂ produziert, die Sensibilität des sAHPs gegenüber dem Calciueinstrom stark erhöht und den sAHP-Strom sogar vor einem durch eine *whole cell*-Messung ausgelösten *rundown* bewahrt (Villalobos et al., 2011).

KCNQ und Neuromodulation. Die PIP₂-Abhängigkeit wird auch durch die Sensitivität des KCNQ/M-Kanals gegenüber Neurotransmittern, die an GPCRs binden, deutlich. Vorrangig werden diese durch Neurotransmitter moduliert, die an den G_q- und G₁₁-Signalweg gebunden sind. Bei Abspaltung dieser G-Proteine von den Rezeptoren wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine Aktivierung der Phospholipase C und damit eine Spaltung von PIP₂ in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) bewirkt. Damit sinken die Konzentration von PIP₂ und somit auch die

Offenwahrscheinlichkeit für KCNQ-Kanäle (Brown & Passmore, 2009; Suh et al., 2004; Winks et al., 2005). Dennoch lässt sich die Wirkung von Forskolin auf den sAHP-Strom nicht mit der Beteiligung von KCNQ-Kanälen erklären, da eine Hemmung der Proteinkinase A in einer früheren Studie keine Wirkung auf den KCNQ-Kanal unterliegenden *M-Current* erzielte (Brown et al., 1989).

KCNQ-Kanäle in der Epilepsie. KCNQ-Kanäle scheinen ein guter Ansatzpunkt für die Entwicklung von Antiepileptika zu sein, so konnte der KCNQ-Aktivator Retigabine bereits erfolgreich in der Epilepsitherapie eingesetzt werden (Harris & Murphy, 2011). Zwar ist die genaue Wirkung von Retigabine noch nicht vollständig bekannt, jedoch konnten Wickenden et al. mit einer Studie an KCNQ2/3-Kanal exprimierenden Zellen zeigen, dass die antikonvulsive Wirkung zumindest zum Teil durch die Aktivierung von KCNQ2/3-Kanälen zustande kommen könnte (Wickenden et al., 2000). Auch der kürzlich synthetisierte KCNQ-Aktivator SF0034 scheint epileptische Aktivität im Experiment verhindern zu können (Kalappa et al., 2015). Diese Wirkung von KCNQ-Aktivatoren in der Epilepsitherapie, die Involvierung der KCNQ-Kanäle in den sAHP-Strom, die Beteiligung von KCNQ-Kanälen an dem SFA-Verhalten von Neuronen (Gribkoff, 2003; Otto et al., 2006; Tzingounis & Nicoll, 2008) und die Entdeckung, dass KCNQ2/3-Kanal Mutationen mit der neonatalen Epilepsie im Zusammenhang stehen (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Lerche et al., 1999; Singh et al., 1998), zeigen die Bedeutsamkeit der Erforschung von KCNQ-Kanälen.

4.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle sind am sAHP-Strom beteiligt

Ein zweiter Kanal-Typ konnte im Rahmen dieser Arbeit als potentieller Kanalkandidat für den sAHP-Strom herausgearbeitet werden. Dabei handelt es sich um die ATP-sensitiven Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle), welche das elektrophysiologische Verhalten einer erregbaren Zelle an ihren metabolischen Zustand koppeln (Tinker et al., 2014).

Tolbutamide reduziert den sAHP-Strom. In einer Studie von Tanner et al. im Jahr 2011 konnte mit cc- und *cell attached*-Messungen an murinen DG-GCs gezeigt werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit von K_{ATP} -Kanäle in Folge eines 20 Hz-*bursts* mit fünf APs erhöht wird. In einer weiteren *perforated* Patch-Clamp-Messung einer offensichtlich spontan-aktiven GC, gemessen im cc-Modus, lösten sie durch kurze wiederholte Strompulse erneut einen AP-*burst* aus. In Folge dessen trat ein hyperpolarisierender Strom auf, welcher zu 30% durch den K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid inhibiert werden konnte (Tanner et al., 2011). Zuvor konnten die K_{ATP} -Kanäle von hippocampalen Neuronen bereits mit einem hyperpolarisierenden Kaliumstrom, der als Folge von Sauerstoffmangel auftrat und durch den K_{ATP} -Kanalblocker Tolbutamide fast vollständig blockiert werden konnte, in Zusammenhang gebracht werden (Godfraind & Krnjevic, 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die vermeintliche Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen am sAHP-Strom von GCs unter definierten vc-Bedingungen überprüft werden. Dabei wurde bei 63% der gemessenen Zellen eine sAHP-Stromabnahme von 60% bei Applikation von

Tolbutamide beobachtet. Die restlichen 37% der gemessenen GCs wiesen keine Amplitudenänderung im Vergleich zur Kontrolle auf.

Ford et al. beobachteten ebenfalls eine Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen am sAHP-Strom von *starburst*-Amakrinzellen der murinen Retina. Jedoch führten sie die Involvierung von K_{ATP} -Kanälen am sAHP auf die Reduzierung von ATP durch eine Verdünnung des intrazellulären Milieus zurück (Ford et al., 2013). In dieser Studie konnte nur in *whole cell*-Experimenten eine Wirkung von Tolbutamide auf den sAHP-Strom festgestellt werden, während der Effekt bei *perforated* Patch-Clamp-Messungen nicht mehr auftrat. Es wäre also denkbar, dass K_{ATP} -Kanäle nur an dem sAHP beteiligt sind, wenn die Zelle gerade einen hohen ATP-Verlust hat und dass die Heterogenität im ATP-Status für den variierenden Tolbutamide-Effekt verantwortlich ist. Ein methodischer Grund für einen unterschiedlichen ATP-Status wäre, wie in der Studie von Ford et al. beschrieben, die Verdünnung des intrazellulären Milieus aufgrund einer *whole cell*-Konformation während einer Patch-Clamp-Messung, welche jedoch hier durch die beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen so gut wie ausgeschlossen werden kann. Eher wäre es vorstellbar, dass GCs aufgrund der Gehirnschnittpräparation oder physiologischer Ursachen, wie zum Beispiel dem Metabolismus, einen unterschiedlichen ATP-Status mitbringen. Es könnte angenommen werden, dass wenn besonders viel ATP in der Zelle vorhanden ist oder die Zelle während eines Spannungspulses aufgrund einer reduzierten AP-Antwort weniger ATP verliert, die K_{ATP} -Kanäle inaktiv bzw. nur wenige Kanäle aktiv sind, dadurch der sAHP-Strom kleiner und damit einhergehend die Wirkung von Tolbutamide weniger stark ist (siehe Abb. 24 A.2). Umgekehrt wäre der K_{ATP} -Kanal bei geringer ATP-Konzentration in der Zelle aktiv, somit der sAHP-Strom größer und der Effekt von Tolbutamide stärker. Ein anderer Faktor, der Einfluss auf die Tolbutamide-Sensitivität nehmen kann ist PIP_2 . Das Phospholipid hebt durch die Stabilisierung des geöffneten Kanals, nicht nur die ATP-Inhibition von K_{ATP} -Kanälen auf, sondern kann auch zu einem Verlust der Tolbutamide-Wirkung führen (Koster et al., 1999). Dass K_{ATP} -Kanäle durch PIP_2 und die Proteinkinase A reguliert werden, kann die Calcium-Abhängigkeit und die Forskolin-Sensitivität des sAHP-Stroms erklären. Denkbar wäre auch, dass Änderungen von Faktoren, wie der Sauerstoffzufuhr oder dem pH-Wert in der Extrazellulärflüssigkeit zu inkonsistenten K_{ATP} -Kanalaktivitäten führen können oder aber auch eine heterogene Expression von K_{ATP} -Kanälen verschiedener GCs einen variierenden Tolbutamide-Effekt erklären (siehe Kapitel 4.7).

Die Wirkung von Diazoxiden wird in Anwesenheit von ATP durch intrazelluläres ADP verstärkt (Larsson et al., 1993). In der Abwesenheit von ATP kann Diazoxide K_{ATP} -Kanäle immer noch stimulieren, solange ADP präsent ist. Tatsächlich kam es in Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu einer konsistenten, sAHP-Strom verstärkenden Wirkung von Diazoxide auf den sAHP-Strom.

Relevanz für die TLE. Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen als Folge einer starken neuronalen Aktivität kann die GCs ebenfalls vor eingehendem, exzessivem Input schützen. Bestärkt wird die Theorie dadurch, dass der Ketonkörper β -Hydroxybutyrat die Offenwahrscheinlichkeit von K_{ATP} -Kanälen erhöht, wodurch der Effekt einer ketogenen

Diät in der Reduktion von epileptischen Anfällen zumindest zum Teil erklärt werden kann (Ma et al., 2007). Außerdem wurde eine verstärkte K_{ATP} -Kanalaktivität bereits mit einer antiepileptischen Funktion in Zusammenhang gebracht (Yamada et al., 2001; Yang et al., 2013).

4.5 Der sAHP-Strom ist zusätzlich Natrium-abhängig

Da neben der Calciumabhängigkeit in manchen Zelltypen, wie neokortikalen Neuronen von Katzen und murinen CA1-PCs, auch eine Natriumabhängigkeit des sAHP beschrieben wurde (Foehring et al., 1989; Gullledge et al., 2013; Schwindt et al., 1989), wurde hier der sAHP-Strom in murinen DG-Körnerzellen auf diese Eigenschaft hin untersucht. Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit eine Natrium-Abhängigkeit festgestellt (Abb. 37). Der Ersatz von Natrium durch Cholin löste eine 70%-ige Abnahme des sAHP-Stroms aus (Kapitel 3.2.7).

Die Na^+/K^+ -Pumpe ist nicht am sAHP-Strom beteiligt. Gullledge et al. fanden in PCs des Neocortex und des Hippocampus, ein sAHP vor, welches ebenso Natrium-abhängig, aber im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen nicht Calcium-abhängig war (Gullledge et al., 2013). Außerdem konnte dieses durch den Blocker von spannungsabhängigen Natriumkanälen TTX inhibiert werden, während der sAHP-Strom der GCs nicht TTX-sensitiv zu sein scheint. Ein weiterer Unterschied der sAHP-Ströme ist, dass die Applikation des Na^+/K^+ -Pumpenblockers Ouabain in der oben genannten Arbeit zu einer vollständigen Abnahme des sAHPs führte. Die Autoren erklärten die Wirkung damit, dass die Aktivität der Pumpe unter physiologischen Bedingungen (Messung bei 35 °C) hauptsächlich von der intrazellulären Natriumkonzentration abhängig ist und somit das Natrium, welches bei einem AP in die Zelle strömt, die Pumpe aktivieren und einen hyperpolarisierenden Kaliumstrom auslösen könnte (Anderson et al., 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch keine Wirkung von Ouabain auf den sAHP-Strom festgestellt werden (Kapitel 3.2.11).

Sind Natrium-abhängige Kaliumkanäle am sAHP-Strom beteiligt? Eine mögliche Ursache für ein Natrium-abhängiges sAHP wären Natrium-abhängige Kaliumkanäle (Schwindt et al., 1989). Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit der sAHP-Strom mit dem oft zur Blockade von K_{Na} -Kanälen eingesetzten Inhibitor Quinidine, fast komplett blockiert werden. K_{Na} -Kanäle werden durch die Gene Slick und Slack kodiert (siehe Kapitel 1.3.1). Da der Slack-Kanal zuvor bereits mit einem Teil des sAHP-Stroms von Neuronen des Spinalnervs von Neunaugen in Verbindung gebracht werden konnte (Wallen et al., 2007), wurde die Beteiligung von Slack-Kanälen am sAHP-Strom von GCs in dieser Arbeit mit dem Blocker Bepridil getestet. Dabei stellte sich eine 60%-ige Abnahme des sAHP-Stroms heraus. Die Tatsache, dass Slack-Kanäle durch die Proteinkinase A moduliert werden, würde auch zu der hier beobachteten Forskolin-Sensitivität passen (Nuwer et al., 2010). In einigen Studien konnte eine funktionelle Kopplung von K_{Na} -Kanälen und TTX-sensitiven spannungsabhängigen Natriumkanälen festgestellt werden (Hage & Salkoff, 2012). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit

jedoch ausgeschlossen werden, da sich TTX in der CTRL-Lösung befand. Dennoch nahm der sAHP-Strom mit einer Blockierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle mit Lidocain zu 92% ab, womit angenommen werden könnte, dass die TTX-insensitiven Na_v -Kanäle des Typs 1.8 und 1.9 in die Aktivierung des sAHP-Stroms involviert sein könnten.

4.6 Die Calcium- und Natriumabhängigkeit des sAHP-Stroms

Die gleichzeitige Abhängigkeit von Calcium und Natrium wirft Fragen auf, vor allem weil die Pharmakologie zeigt, dass beide Komponenten gewissermaßen den gesamten sAHP-Strom „beanspruchen“ können: Sowohl der Calciumkanalblocker Nickel, als auch der Natriumkanalblocker Quinidine und Lidocain blockierten den sAHP-Strom vollständig (Kapitel 3.2.2.1, 3.2.8, 3.2.9). Bisher wurden eher aktivitätsabhängige Natriumkomponenten oder eine Zusammensetzung des sAHP-Strom aus einer Natrium- und einer Calcium-abhängigen Komponente beschrieben (Schwindt et al., 1989; Wallen et al., 2007).

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist nicht am sAHP-Strom beteiligt. Eine Möglichkeit die Natrium- und Calciumkomponenten miteinander zu vereinen, wäre die Annahme, dass eine Natrium-induzierte Calciumfreisetzung über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (engl. *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*, NCX) stattfindet. Der NCX transportiert drei Natriumionen mit dem Konzentrationsgradienten von außen nach innen, während entgegen des Gradienten ein Calcium-Ion von innen nach außen transportiert wird (Palty et al., 2012). So könnte ein Calcium-abhängiger sAHP-Strom sekundär durch eine Natrium-abhängige Calciumerhöhung aktiviert werden. Jedoch konnte mit der Applikation des NCX-Blockers CGP-37157 keine Wirkung auf den sAHP-Strom erzielt werden (Kapitel 3.2.11).

Unspezifische Wirkung einiger Pharmaka? Da die prozentuale Abnahme des sAHP-Stroms während der Bepridil-Applikation zu der ebenso ca. 60%-igen sAHP-Stromabnahme mit Cholinchlorid passt, wäre es also möglich, dass die Blocker Quinidine und Lidocain nicht spezifisch Natrium- und K_{Na} -Kanäle binden, sondern gleichzeitig auch andere Kanäle beeinträchtigen. Tatsächlich wurde für beide Blocker zumindest im Herzen auch eine Wirkung auf K_{ATP} -Kanäle beschrieben (Olschewski et al., 1996; Scholz, 2002; Undrovinas et al., 1990). Es könnte also die vorsichtige Annahme gemacht werden, dass Slack-Kanäle, aufgrund der Bepridil-Wirkung am sAHP-Strom beteiligt sind, während ein Teil der Wirkung von Quinidine und Lidocain jedoch auf eine unspezifische Bindung an andere Kaliumkanäle, wie den K_{ATP} -Kanälen zurückzuführen ist. Die vollständige Abnahme des sAHP-Stroms durch Calciumkanalblocker wäre dann mit der Beteiligung von Slack-Kanälen zu erklären, welche ebenso einer PIP_2 -Regulation unterliegen (de los Angeles Tejada et al., 2012). Aufgrund der eingeschränkten Spezifität der Pharmaka, müssen andere Methoden, wie die RNA-Interferenz (Kapitel 4.8) zum Einsatz kommen um die Stromkomponenten endgültig zu definieren.

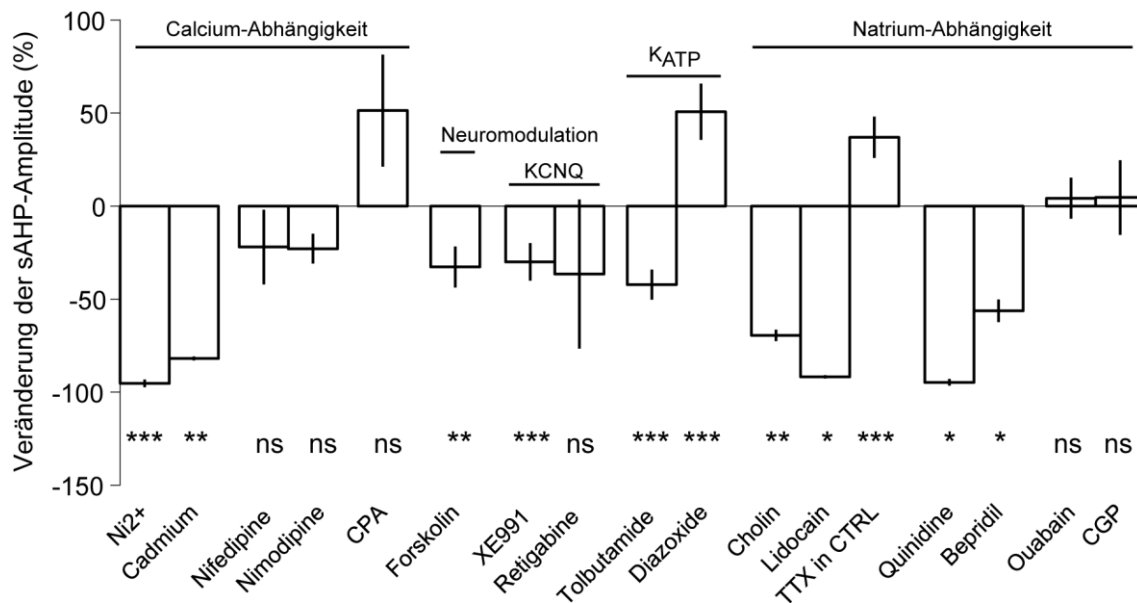


Abb. 37: Übersicht über die gemittelte, prozentuale Veränderung der sAHP-Amplitude während des Einflusses der getesteten Pharmaka in *perforated Patch-Clamp*-Experimenten. Das Balkendiagramm stellt eine Zusammenfassung aller verwendeten Pharmaka und ihrer Wirkungen auf die max. sAHP-Amplitude dar. Dabei zeigen die negativen Werte die prozentuale Abnahme und die positiven Werte die Zunahme der sAHP-Amplitude. Das Diagramm lässt eine Calciumabhängigkeit ohne Identifikation der Calciumquelle, eine modulierende Funktion der Adenylatzyklase, eine Beteiligung von KCNQ- und K_{ATP}-Kanälen und eine Natriumabhängigkeit des sAHP-Stroms erkennen.

4.7 Molekulare Diversität der langsamen Nachhyperpolarisierung

Obwohl einige Eigenschaften des sAHP-Stroms, wie die Calcium- und Natrium-Abhängigkeit, die Kinetik und die Neuromodulation in allen gemessenen Zellen gleichermaßen ermittelt werden konnten, kann die Identität der verantwortlichen Kaliumkanäle nicht für jede Körnerzelle vorhergesagt werden (Abb. 37).

Die heterogene Beteiligung von K_{ATP}- und KCNQ-Kanälen. Die Arbeit zeigt eine ungleiche Beteiligung von KCNQ- und K_{ATP}-Kanälen am sAHP-Strom von GCs. Neben heterogenen Aktivierungsmechanismen könnte der sAHP-Strom in verschiedenen Körnerzellsubpopulationen von unterschiedlichen Kanälen oder Kanalkompositionen exprimiert werden. Diese Hypothese wurde in einem Stufenexperiment mit drei hintereinander applizierten Blockern von KCNQ-, K_{ATP}- und Calciumkanälen untersucht (Kapitel 3.2.12). Dabei konnten verschiedene Konstellationen herausgestellt werden. Die Messungen zeigten entweder eine etwa gleiche Beteiligung von KCNQ- und K_{ATP}-Kanälen (33%), die alleinige Beteiligung einer der beiden Kanäle (50%) oder aber gar keine Beteiligung (17%) der beiden Kanäle. Der Reststrom konnte dabei konsistent mit dem Calciumkanalblocker Nickel inhibiert werden, so dass sicher ist, dass es sich in allen Fällen um Calcium-abhängige Ströme handelte.

Gemeinsamkeiten der sAHP-Kanäle. Neben der K_{ATP}- und KCNQ-Kanalbeteiligung wurde die Beteiligung von Quinidine-sensitiven – wahrscheinlich K_{Na}-Kanäle – am

sAHP-Strom festgestellt (Kapitel 3.2.9). Ob diese durch Slack-Kanäle vertreten werden, ist aufgrund der unspezifischen, pharmakologischen Substanzen noch nicht abschließend geklärt (Kapitel 3.2.10). Es gibt eine Eigenschaft, welche die K_{ATP} - und K_{Na} -Kanäle verbinden könnte, nämlich die Kopplung an den Energiehaushalt der Zelle (Dryer, 1994). Je nach Energiezustand der Zelle, könnten K_{ATP} - und K_{Na} -Kanäle mehr oder weniger stark an dem sAHP-Strom beteiligt sein.

Außerdem ist auffällig, dass bestimmte, zuvor beschriebene Eigenschaften der drei herausgestellten Kanäle, wie die PIP_2 -Regulation (Baukrowitz et al., 1998; de los Angeles Tejada et al., 2012; Zaydman & Cui, 2014), die Neuromodulation (Delmas & Brown, 2005; Lin et al., 2000; Santi et al., 2006) und die Beteiligung am *burst*-Phänotyp (Beguín et al., 1999; Yang et al., 2007; Yue & Yaari, 2004) übereinstimmen und ebenso auch mit den Eigenschaften des sAHP-Strom vereinbar sind (dargestellt in Abb. 38). Die PIP_2 -Regulation kann die Calciumabhängigkeit des sAHP-Stroms erklären. Es ist bekannt, dass Calcium die lokale Verfügbarkeit von PIP_2 erhöhen kann und diese Einfluss auf eine Vielzahl von Kaliumkanälen haben kann (de los Angeles Tejada et al., 2012; Delmas & Brown, 2005; Hansen et al., 2011). Passend dazu zeigte eine Studie, dass eine alleinige Erhöhung von dem PIP_2 -produzierenden Enzym PIP-5K zu keinem Effekt auf den sAHP-Strom führt und dass eine Erhöhung von Calcium notwendig ist (Villalobos et al., 2011). Die Calciumabhängigkeit des sAHP-Stroms wäre also durch einen der PIP_2 -Aktivität vorgeschalteten Mechanismus zu erklären.

Eine weitere Gemeinsamkeit ist die potentielle antiepileptische Wirkung der herausgestellten Ionenkanäle. So konnte der KCNQ-Aktivator Retigabine bereits schon erfolgreich in der Epilepsitherapie angewendet werden (Wickenden et al., 2000), außerdem konnte eine verstärkte Aktivität von K_{ATP} -Kanälen mit einem antiepileptischen Effekt in Zusammenhang gebracht werden (Yang et al., 2013) und eine erhöhte Slack-Kanalaktivität wird ebenso für die Ausbremsung von epileptischen Aktivitäten diskutiert (Igelstrom, 2013). Somit stellen die alpha-Untereinheiten $K_{ir6.2}$ (K_{ATP} -Kanäle), KCNQ2 und -3 und KCNT1 (Slack-Kanäle) einen Hotspot in der Epilepsieforschung dar (Köhling & Wolfart, 2016).

sAHP-Kanäle und die Messmethode. Der molekulare Mechanismus und die beteiligten Ionenkanäle lassen eine Erklärung für die Vulnerabilität des sAHP-Stroms gegenüber der anionischen Zusammensetzung zu. Deutlich wird diese Eigenschaft beispielsweise durch die Beteiligung von K_{ATP} -Kanälen am sAHP-Strom, welche wiederum durch zahlreiche Faktoren, wie Phospholipide, Acetyl-Coenzym A, den pH-Wert und Phosphorylierung via PKA und PKC reguliert werden (Hund & Mohler, 2011). Dass einer dieser Faktoren aufgrund einer intrazellulären Milieuveränderung verändert vorliegt ist sehr wahrscheinlich und kann somit eine sAHP-Stromabnahme zur Folge haben. Die PIP_2 -Bindung aktiviert ebenso KCNQ- und Slack-Kanäle und es konnte gezeigt werden, dass die *whole cell*-bedingte Abnahme des sAHP-Stroms durch die verstärkte Synthese des PIP_2 -produzierenden Enzyms PIP-5K aufgehalten werden kann (Villalobos et al., 2011). Ein weiterer Grund ist die sensible Calcium-Homöostase in der Zelle (Brini et al., 2013). Da der sAHP-Strom Calcium-abhängig ist können sehr kleine Änderungen der

intrazellulären Calciumkonzentration bereits Auswirkungen auf den sAHP-Strom haben. Neben der Wahl der Patchpipettenlösung scheint außerdem die Messtemperatur einen Einfluss auf die Eigenschaften des sAHP-Stroms zu haben. Gullledge et al. stellten fest, dass das sAHP von PCs der CA1-Schicht und des Cortex nur bei Raumtemperatur eine Calciumabhängigkeit besitzen, während bei einer physiologischen Temperatur diese durch eine Natriumabhängigkeit ersetzt wird (Gullledge et al., 2013). In dieser Arbeit wurde der sAHP-Strom bei Raumtemperatur gemessen. In Zukunft können Messungen bei physiologischer Temperatur klären, ob sich die Eigenschaften und die beteiligten Kanäle und Kanalkompositionen unter diesen Bedingungen verändern.

Theorien für die Existenz einer molekularen Diversität des sAHP-Stroms. Der Vergleich früherer Studien zeigt, dass es eine große Vielfalt an beschriebenen sAHP-Kanälen in verschiedenen Tiermodellen und Zelltypen gibt (siehe Kapitel 1.3.1). In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich eine Heterogenität in ein und demselben Zelltyp beobachtet werden. Somit kann vermutet werden, dass dem sAHP-Strom nicht ein spezifischer Ionenkanal oder eine festgelegte Ionenkanalkomposition zugeordnet werden kann, sondern eher eine breite Palette von möglichen Ionenkanälen, die in verschiedenen Konstellationen am sAHP-Strom teilhaben können (dargestellt in Abb. 38). Die individuelle Zusammensetzung dieser Kanäle am sAHP-Strom wäre dann abhängig von gegenwärtigen Umständen in der Zelle. Alternativ könnten die heterogenen Kanalkompositionen in verschiedenen GCs auch unterschiedliche Reifungsstadien von GCs repräsentieren, da GCs einer kontinuierlichen Neurogenese unterliegen und somit Zellen unterschiedlichen Alters im DG vorzufinden sind (Liu et al., 2000; van Praag et al., 2002). Es wäre aber auch denkbar, dass der variable synaptische Input während der Entwicklung oder auch im reifen Zustand, den GCs eine eigene Identität mit einer spezifischen sAHP-Strom Regulation verleiht. Abgesehen davon wie die molekulare Diversität zustande kommt, bietet sie den GCs eine enorme Flexibilität in der Kontrolle und Regulation ihrer AP-Entladungen und lässt sie sich schnell an neue Situationen anpassen.

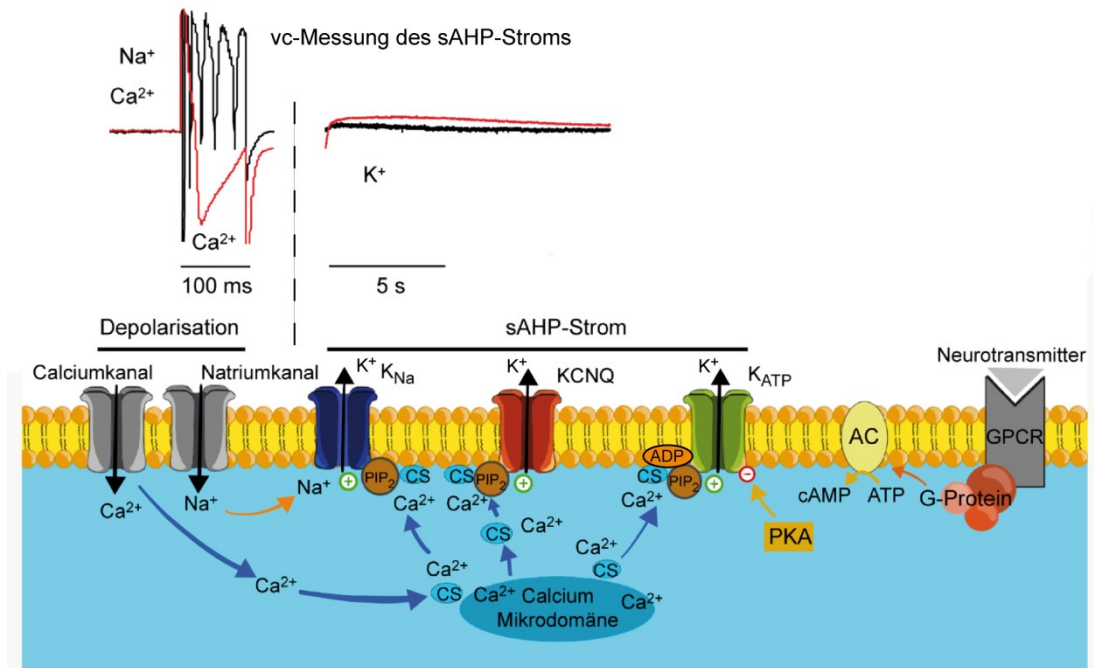


Abb. 38: Der potentielle, molekulare Mechanismus des sAHP-Stroms in einer schematischen Darstellung. Die Stromspuren des sAHP-Stroms werden in zwei Abschnitte unterteilt: Im ersten Abschnitt werden Natrium (Na^+)- und Calcium (Ca^{2+})-einströme durch einen depolarisierenden Spannungspuls ausgelöst. Die schwarze Stromspur wurde im ACSF aufgenommen und zeigt die Aktionspotentiale (APs) in ihrer ursprünglichen Form. Die rote Stromspur zeigt die Messung in der CTRL-Lösung. Hier zeigt sich ein breites AP mit Calciumeinstrom. Die Graphik stellt eine Zellmembran mit verschiedenen Ionenkanälen dar. Das Calcium sammelt sich in Mikrodomänen im Zytoplasma und wird von Calciumsensoren (CS) gebunden, welche daraufhin zu den Ionenkanälen in der Membran wandern. Dort erhöht Calcium die Verfügbarkeit von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), welches die potentiellen sAHP-Kanäle, wie die K_{Na} -, KCNQ - und K_{ATP} -Kanäle, regulieren kann. Außerdem können die Kanäle durch eine Neuromodulation über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher die Adenylatzyklase (AC) aktiviert und dadurch zu der Umsetzung von ATP zu cAMP führt, negativ (-) moduliert werden. Hinzukommen die verschiedenen, spezifischen Mechanismen der Kanäle, wie die Natriumabhängigkeit der K_{Na} -Kanäle und die ATP-Abhängigkeit (ATP-Fehlen und gleichzeitige höhere Verfügbarkeit von AMP erhöht Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle) der K_{ATP} -Kanäle. Durch die Aktivierung der Kaliumkanäle wird die langsame Nachhyperpolarisierung ausgelöst, welche in der Stromspur als ein Auswärtsstrom zu erkennen ist.

4.8 Zukünftige Knock Down-Experimente

Für zukünftige *Knock Down*-Experimente im Rahmen der sAHP-Strom-Untersuchung von Körnerzellen sollen miRNAs zur Unterdrückung der Expression von KCNQ-, K_{ATP} und K_{Na} -Kanälen, wie Slack-Kanälen genutzt werden, um daraufhin die Auswirkungen auf den sAHP-Strom elektrophysiologisch zu untersuchen. Der *Knock Down* dieser Kanalproteine könnte helfen, deren Beteiligung an dem Ionenstrom zu klären. Folgende Vorarbeiten und Schlussfolgerungen zur Etablierung der RNAi in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) konnten dafür im Rahmen dieser Arbeit gemacht und heraus gestellt werden.

- Für eine schnelle und einfache Produktion von inhibitorischer RNA-kodierender DNA kann der RNAi Designer von Invitrogen genutzt werden. Diese kann über eine Klonase-Reaktion in DNA-Vektoren gebracht werden, die zum Gentransfer genutzt werden können.
- Die Körnerzellen von organotypische Schnittkulturen des Hippocampus mit einem Teil des EC besitzen vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften wie Körnerzellen von akuten Gehirnschnitten (insbesondere der sAHP-Strom) und können für *Knock Down*-Experimente zum Einsatz kommen.
- Lipofectamine und Adenoviren konnten für die Einbringung der DNA in die Körnerzellen von hippocampalen Schnittkulturen keine Erfolge erzielen.

RNA-Interferenz via BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Technik. Mit der RNA-Interferenz-(RNAi)-Technologie kann postnatal in *in vitro*- oder *in vivo*-Experimenten ein *Knock Down* erzielt werden. Für die Wahl und Erstellung der miRNA-kodierenden Sequenzen, sowie die Bereitstellung von DNA-Vektoren für den Gentransfer und die Expression in der Zelle, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die ‚BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi‘-Technik von Invitrogen zurückgegriffen (Kapitel 2.2.1.1). Dabei kamen ein Expressionsvektor und ein adenoviraler Vektor zum Einsatz, in welche die miRNA-kodierende DNA eingebaut wurde. Nach dem Gentransfer der eingesetzten Plasmide mit entsprechendem miRNA-Gen konnte eine stabile und intensive Expression der DNA, welche nach dem Gentransfer im Zellkern epichromosomal vorliegt (Walther & Stein, 2000), über mehrere Tage hinweg in den Zellen beobachtet werden. Ein großer Vorteil der gewählten Technik ist, dass die DNA-Vektoren den Einbau von mehreren miRNA-Sequenzen erlauben und somit in Zukunft die in dieser Arbeit herausgestellten potentiellen sAHP-Strom-Kanalkandidaten alle gleichzeitig in einer Zelle ausgeschaltet werden können, um die Auswirkungen auf den sAHP-Strom zu untersuchen.

Um einen optimalen *Knock Down* eines Kanalproteins zu erzielen, muss nach der Einbringung der miRNA-kodierenden DNA in die Zielzellen, die Expression der eingeschleusten Gene, die miRNA-Prozessierung und Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA, sowie die Proteolyse von bestehenden, nativen Kanalproteinen in den Membranen abgewartet werden. Dafür sollten drei bis fünf Tage eingeplant werden. Um eine *in vivo*-Injektion, vor allem in der Testphase zu umgehen, wären organotypische

Schnittkulturen grundsätzlich eine gute Möglichkeit die Etablierung des Gentransfers und die Untersuchung der miRNA-Expression zu erproben.

Organotypischen Schnittkulturen. Um die organotypischen Schnittkulturen für den Einsatz von RNA-Interferenz und einer anschließenden Untersuchung des sAHP-Stroms zu nutzen, musste zunächst geklärt werden ob die Elektrophysiologie der GCs in einer OHSC mit der des Akutschnittes vergleichbar ist. Bei der Messung der Standard-Parameter fiel auf, dass die AP-Amplitude im Vergleich zum Akutschnitt um 18 % erhöht vorlag. Der V_{Rest} wich mit 6 % nur minimal von dem Ruhemembranpotential im Akutschnitt ab. Die veränderten Parameter können auch aufgrund des Entwicklungsstadiums des Tieres auftreten, da OHSCs von 4-5 Tage alten Spendertieren angefertigt wurden (Du & Bradley, 1996). Die anderen Werte waren alle vergleichbar mit denen im Akutschnitt. In einem ersten pharmakologischen Testexperiment mit Applikation des K_{ATP} -Kanalblockers Tolbutamide kam es, genau wie im Akutschnitt, zu einer Reduktion des sAHP-Stroms. Die Ergebnisse zeigen, dass die Elektrophysiologie von GCs im OHSC mit kleinen Abweichungen derjenigen von GCs im Akutschnitt entspricht und die OHSCs somit für weitere Untersuchungen des sAHP-Stroms zum Einsatz kommen können.

Transfektion der OHSC via Lipofectamine. Das Kontroll- und pcDNA6.2-miRNA Plasmid wurden zunächst mittels Lipofectamine (Invitrogen) in die OHSCs eingebracht. Lipofectamine formt kleine Liposomen, welche mit den negativ geladenen Nukleotiden der DNA interagieren und diese über eine Fusion mit der Zellmembran in das Zellinnere transportieren (Kim & Eberwine, 2010). Die meisten transfizierten Zellen traten auf, wenn die DNA-Lipofectamine-Lösung als Tropfen direkt auf die Schnittkultur appliziert wurde. Jedoch war die Transfektionsrate mit höchstens 40 Zellen je Schnittkultur immer noch viel zu niedrig. Es konnten auch nur vereinzelt fluoreszierende Zellen im DG gefunden werden, welche anhand ihrer Morphologie und Elektrophysiologie als Gliazellen identifiziert wurden. Die Lipofektion ist ein langsamer Prozess, da diese auf Endozytose angewiesen ist. Die Inkubationszeit, während der die OHSCs in Berührung mit dem Tropfen standen, könnte somit aufgrund der Verflüssigung zu den Rändern der Kulturen zu kurz gewesen sein. Hinzukommt, dass Astrozyten eine Grenzschicht zwischen dem Kulturmedium und den OHSCs bilden, wodurch die Diffusion der DNA-Lipofectamine-Lösung zu den neuronalen Zellen erschwert wird (del Rio et al., 1991; Hailer et al., 1996; Muller et al., 1993). Außer der physischen Barriere und der Inkubationszeit gibt es weitere Parameter, die die Effektivität der Transfektion beeinflussen. Dazu gehört die Größe und Stabilität der DNA-Lipofectamine-Komplexe, und das Verhältnis von DNA zu Lipofectamine (Chesnoy & Huang, 2000; McQuillin et al., 1997; Mortimer et al., 1999). Das 3:1 (Lipofectamine:DNA)-Verhältnis schien die besten Erfolge zu erzielen, jedoch limitierte die Toxizität des Lipofectamine-Komplexes den Einsatz von höheren Konzentrationen (Romøren et al., 2004; Zhang et al., 2012). Aufgrund der geringen Reichweite von Lipofectamine-DNA-Komplexen und der Toxizität des Komplexes wurde im nächsten Schritt auf eine virale Gentransfer-Methode ausgewichen.

Gentransfer via Adenovirus. Der Vorteil des Einsatzes von Adenoviren liegt in der hohen Transduktionseffizienz und gleichzeitigen Abwesenheit von viraler Toxizität (Vannucci et al., 2013). Sie infizieren in *in vitro*- wie auch in *in vivo*-Experimenten eine Vielzahl verschiedener Zelltypen. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Adenoviren wurden mittels drei verschiedener Applikationsmethoden auf die OHSCs gebracht. Dabei zeigte sich, ein paar Tage nach der Transduktion, bei allen Methoden eine großflächige Infizierung von Zellen über die OHSCs verteilt. Die Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop enthüllte jedoch, dass die GFP-positiven Zellen in einer anderen Ebene als die Neuronenbänder lagen, welche anhand von NeuN- und Prox1-Markern identifiziert werden konnten. Zusätzlich war eine Gliazellmorphologie der infizierten Zellen zu erkennen. Der Virus infizierte scheinbar ausschließlich Gliazellen, die an der Oberfläche lagen. Bei einigen OHSCs, bei denen der Virus via Mikroinjektion appliziert wurde, konnten unter Anregung mit Licht der Wellenlänge ~ 480 nm jedoch auch GFP-positive Zellen im Körnerzellband aufgefunden werden. Die intensive GFP-Expression erschwerte dabei jedoch die Identifikation von individuellen Zellen. Bei der elektrophysiologischen Messung von fluoreszierenden Zellen im Körnerzellband zeigten sich zwei verschiedene Populationen. Zum einen Zellen mit einem Eingangswiderstand von im Mittel $50\text{ M}\Omega$ und einem Membranpotential von -76 mV und zum anderen Zellen mit einem Eingangswiderstand von im Mittel $520\text{ M}\Omega$ und einem Membranpotential von -71 mV . Beide Populationen feuerten keine Aktionspotentiale als Antwort auf einen Strompuls. Diese Beobachtung spricht gegen die Messung einer Körnerzelle. Die *post hoc*-Fluoreszenzmikroskopie mit Markierung der GCs und der gemessenen Zellen bestätigte die Patch-Clamp-Messungen und zeigte, dass GFP-exprimierende Zellen vor allem in der subgranulären Zone auftreten und ihre vertikal-orientierten, radialen Fasern zwischen den GCs her verlaufen. Der Morphologie entsprechend handelte es sich dabei wahrscheinlich größtenteils um radiale Gliazellen, welche als Vorläuferzellen zur Generierung von neuen Neuronen und Gliazellen fähig sind (Garcia et al., 2004). Diese Beobachtungen würden auch zur Elektrophysiologie der gemessenen Zellen passen. In einer Studie von Fukuda et al. wurden die radialen Gliazellen anhand ihres Eingangswiderstandes in Typ I ($R_{\text{in}} < 500\text{ M}\Omega$)- und Typ II ($R_{\text{in}} > 500\text{ M}\Omega$)-Zellen eingeteilt und zeigten ein ähnliches Membranpotential von -80.4 (Typ I) und -67 mV (Typ II) (Fukuda et al., 2003).

Dass die Adenoviren keine Neurone in den OHSC infizierten, kann mit dessen Tropismus zusammenhängen. Der Tropismus eines Virus wird durch die Bindung eines spezifischen Rezeptor an die Oberfläche der Wirtszelle festgelegt (Arnberg, 2012; Lutschg et al., 2011). Der Tropismus von Ad5-Vektoren wird beispielsweise durch die Bindung an seinen Hauptrezeptor, den Coxsackie- und adenoviralen Rezeptor (CAR), bestimmt. Da der Adenovirus das Gehirn natürlicherweise eigentlich nicht infizieren kann, sondern hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege auslöst, kann es vorkommen, dass das Zielgewebe im Gehirn nur wenig bis keine CARs exprimiert und dadurch gegen den Adenovirus resistent ist. Zum Beispiel resultierte in einer Studie mit dopaminergen Neuronen der murinen *Substantia nigra* die limitierte Expression von CAR in einer schwachen Transduktion der Zellen (Lewis et al., 2010). Bei einer transgenen Maus mit erhöhter CAR-Expression hingegen wurde eine verstärkte Transduktion von Neuronen

beobachtet. Die Expression von CAR im zentralen Nervensystem ist noch nicht gut erforscht und es wurden bereits CAR-unabhängige Mechanismen für Adenoviren entwickelt um die Problematik zu umgehen (Grellier et al., 2011; Hildebrandt et al., 2010). Auch wenn Adenoviren in der Neurowissenschaft bereits erfolgreich für den Gentransfer in neuronale Zellkulturen (Caillaud et al., 1993), *in vivo* z. B. im *Putamen* (Davidson et al., 1993), und auch in hippocampalen Schnittkulturen (Kasparov et al., 2002; Miyaguchi et al., 2000; Ridoux et al., 1995; Robert et al., 1997; Sato et al., 2004) eingesetzt werden konnten, kann keine sichere Vorhersage zur Effizienz des adenoviralen Gentransfers in einem spezifischen Experiment getroffen werden. Das liegt daran, dass dabei der individuelle, adenovirale Vektor, die Wahl der Zielzellen und die Immunantworten des Gewebes bzw. des Tieres eine Rolle spielen. Außerdem kann die Wahl des Promotors ebenso eine Rolle für die erfolgreiche Expression von Transgenen in Zielzellen spielen. Unter der Kontrolle des CMV-Promotors wurde zwar im Vergleich zu anderen Promotoren die stärkste Genexpression gefunden. Jedoch zeigte die gleiche Studie, dass der CMV-Promotor in Zellen des DG nur eine minimale Expression zeigt (Smith et al., 2000). In einer weiteren Studie konnte beobachtet werden, dass die gleichzeitige Infektion von Neuronen und Gliazellen zu einer Unterdrückung der CMV-Promotor-Aktivität in Neuronen führt, während diese in Gliazellen hochaktiv ist (Kugler et al., 2003; Kugler et al., 2001).

Um einen Transfer der miRNA-kodierenden DNA in die GCs des DG in Zukunft zu erreichen, wäre also eine Modifizierung der Virus-DNA durch einen Austausch des Promotors denkbar. Mit dem RSV (Rous sarcoma virus)- Promotor konnte beispielsweise eine stärkere Expression in GCs gezeigt werden (Smith et al., 2000). Der Synapsin-Promotor würde ebenfalls in Frage kommen und den Vorteil haben, dass die Genexpression nur in Neuronen stattfindet (Kugler et al., 2003). Gleichzeitig könnte das Gliazell-Neuronen-Verhältnis optimiert werden z.B. durch den Einsatz von serum-freien Medium (Brewer, 1995) oder antimitotischen Substanzen, wie Cytosine arabinoside, Uridine und 5-fluoro-2-Deoxyuridine (Cho et al., 2007). Falls diese Methoden zu keinem Ergebnis führen, sollte entweder über eine Modifizierung der Virushülle nachgedacht werden, so dass der Virus an einen anderen Rezeptor als an CAR bindet (Hildebrandt et al., 2010) oder aber über den Einsatz eines alternativen Virus.

4.9 Schlussfolgerung und Aussicht

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Körnerzellen des *Gyrus dentatus* einen „Alles-oder-Nichts“-*burst*-Phänotypen besitzen, welcher in Zusammenhang mit der sAHP-Strom-Ausprägung steht. Der sAHP-Strom wurde als ein Calcium-abhängiger Kaliumstrom mit einer ungewöhnlichen gleichzeitigen Natrium-Abhängigkeit identifiziert. Dabei wurde eine heterogene Beteiligung von K_{ATP} - und KCNQ-Kanälen rausgearbeitet. Die Natriumabhängigkeit kommt wahrscheinlich durch eine Beteiligung von K_{Na} -Kanälen zustande. Diese Arbeit unterstützt die Theorie, dass der sAHP-Strom keinen Ionenstrom darstellt, der durch einen einzigen, vorhersagbaren Ionenkanal-Typ fließt, sondern eher einen Mechanismus, der die Calcium- und PIP_2 -Abhängigkeit vereint. Damit kann auch die Neuromodulation, sowie die Sensitivität des sAHP-Stroms gegenüber intrazellulären Milieuänderungen erklärt werden. Der Mechanismus involviert ein Set an möglichen, einsetzbaren sAHP-Kanälen, die je nach Lokalisierung, wie z. B. der Nähe zu einem bestimmten Calciumkanal, nach zellulärer Aktivität und nach Energiezustand der Zelle am sAHP-Strom beteiligt sind. Die Zellaktivität wird damit individuell an die intrinsischen Gegebenheiten der Zelle angepasst.

Aufgrund des Mangels an selektiven Inhibitoren und der ungewöhnlichen Pharmakologie, erlauben die pharmakologischen Daten keine zweifelsfreie Zuordnung von Ionenkanälen zum sAHP-Strom. Der *Knock Down*, also die Repression oder die vollständige Blockierung der Proteinexpression, ist eine vielversprechende Methode um die Beteiligung der herausgearbeiteten Kanaltypen am sAHP-Strom zu bestätigen und weiter zu charakterisieren. Die entsprechenden Techniken, die für den *Knock Down* von Proteinexpressionen in organotypischen Schnittkulturen benötigt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert und erprobt. Dabei konnte gezeigt werden, dass OHSCs ein geeignetes Zellkulturmodell für die Untersuchung des sAHP-Stroms darstellen und der Gentransfer in Zellen der OHSCs prinzipiell möglich ist. Die Schwierigkeit liegt in dem Erreichen der Neurone, welche von Gliazellschichten bedeckt werden. Durch eine Modifizierung der DNA, z. B. durch einen Körnerzell- oder Neuronen-spezifischen Promotor und die Etablierung von optimalen Kulturbedingungen für OHSC ohne übermäßiges Gliazellwachstum, kann ein Gentransfer in Neuronen in Zukunft ermöglicht werden.

Wenn der Gentransfer in GCs Erfolge erzielt, kann die Expression von einzelnen Ionenkanälen oder aber mehreren Ionenkanälen gleichzeitig über den *Knock Down* mit einem adenoviralen BLOCK-iTTM-miRNA-Vektor herunterreguliert bis vollständig verhindert werden. Die Beteiligung der verschiedenen, potentiellen sAHP-Kanäle welche in dieser Arbeit pharmakologisch herausgearbeitet wurden, kann damit weiter aufgeklärt werden. Außerdem können bei Gentransfer-Erfolgen weitere Experimente wie eine Überexpression der sAHP-Kanäle folgen. In dem Kainat-Modell kann z. B. die Auswirkung dieser Überexpression auf den sAHP-Strom in Hinsicht auf einen potentiellen, antikonvulsiven Mechanismus untersucht werden.

IV. Zusammenfassung

Die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (DG) spielen als „Eingangstor“ für die meisten afferenten Fasern aus dem Cortex in den Hippocampus eine wichtige Rolle für die Kontrolle der neuronalen Aktivität in dieser Region. Da die hippocampale Formation auch von Temporallappenepilepsie (TLE) betroffen ist, kommt intrinsischen Mechanismen von Körnerzellen zur Abschwächung von Übererregung eine potentiell bedeutende Filterfunktion zu. Ein solcher Mechanismus wäre das langsame, hyperpolarisierende Nachpotential (*slow afterhyperpolarisation*, sAHP), welches in vielen Zelltypen nach einer Abfolge von Aktionspotentialen auftritt. In Körnerzellen tritt das sAHP nur auf, wenn das intrazelluläre Calcium-Milieu nicht gestört wird und es ist nach wie vor unklar welche Ionenkanäle für das sAHP verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Anwendung der *perforated*-Patch-Clamp-Methode gezeigt, dass *in vitro* so gut wie alle Körnerzellen einen prominenten sAHP-Strom zeigen. Dieser steht in Verbindung zu einem funktionellen „Alles-oder-Nichts“-*burst*-Phänotyp, der so noch nicht beschrieben wurde. In der Spannungsklemme (*voltage clamp*) wurde hier der sAHP-Strom pharmakologisch analysiert. Der sAHP-Strom wurde, wie zuvor beschrieben, als ein Calcium-abhängiger Kaliumstrom mit einer Sensitivität gegenüber Neuromodulation charakterisiert. Eine zuvor mit variablen Messtechniken gemessene Beteiligung von KCNQ- und K_{ATP} -Kanälen konnte nur teilweise bestätigt werden. Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit eine zusätzliche Natrium-Abhängigkeit des sAHP-Stroms nachgewiesen. Diese kommt vermutlich durch die Beteiligung von Natrium-abhängigen Kaliumkanälen, wie dem *Slack*-Kanal zustande. Aufgrund des Mangels an selektiven Inhibitoren, erlauben die pharmakologischen Daten jedoch keine zweifelsfreie molekulare Zuordnung.

Der *Knock Down*, also die Repression der Proteinexpression, ist eine vielversprechende Methode um die am sAHP-Strom beteiligten Ionenkanäle abschließend zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden zwei Techniken, die für den *Knock Down* von Proteinexpressionen via RNA-Interferenz in organotypischen Schnittkulturen (OHSC) geeignet wären, erprobt und teilweise etabliert. Der Gentransfer von miRNA-kodierender DNA in OHSC-Zellen via Lipofektion wurde durch eine Gliazellschicht erschwert. Mit Adenoviren konnte zwar eine robuste Transgen-Expression in Gliazellen, jedoch trotz vieler verschiedener Ansätze keine Infizierung von Neuronen erzielt werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit 1. ein entscheidender Einfluss des sAHP-Stroms auf einen bisher unbeschriebenen *burst*-Phänotyp von Körnerzellen festgestellt werden, 2. die dem sAHP-Strom zugrundeliegenden Ionenkanäle im Mittel zu etwa je einem Drittel den K_{ATP} - und KCNQ-Kanälen und einem weiteren Kanal (vermutlich dem *Slack*-Kanal) zugeordnet werden, 3. eine weit höhere Variabilität in dem Beitrag der Kanäle zum sAHP-Strom als bisher vermutet, aufgezeigt werden und 4. die Methoden für einen kontrollierten Gentransfer in OHSC-Zellen etabliert werden.

V. Anhang

In den Tabellen: Tabelle 16 - Tabelle 20 sind die Einzelstrang-Sequenzen der verwendeten *top* und *bottom*-Oligonukleotide (pre-miRNA) aufgelistet. Bis auf die in Kapitel 2.2.1.1 (Tabelle 4) aufgelistete Einzelstrang-DNA (hier mit zwei Sternen markiert) kamen die restlichen Oligonukleotide jedoch noch nicht im Gentransfer-Experiment (Kapitel 2.2.3) zum Einsatz. Alle *top* und *bottom*-Oligonukleotide wurden via *Annealing* (Kapitel 2.2.1.1) aneinandergelagert und die so entstandene Doppelstrang-DNA in den Expressionsvektor pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR integriert. Die Oligonukleotide, die bereits in den adenoviralen Vektor: pAd/CMV/V5-DESTTM kloniert wurden, sind mit einem Stern (*) markiert. Zwei Sterne markieren die miRNA-kodierenden Sequenzen, welche bereits in einen Adenovirus (Ad/CMV/EmGFP-miRNA) eingebaut sind.

Tabelle 16: Die (pre-) miRNA-Einzelstrang Sequenzen (*top* und *bottom*) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP}-Kanal Untereinheiten, welche über das Gen Kcnj11 kodiert werden.

Primer Name	Sequenz
Mmi512452_top_Kcnj11**	TGC TGT GAC AAT GAT CTC CAG GTC CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGG ACC TGG ATC ATT GTC A
Mmi512452_bot_Kcnj11**	CCT GTG ACA ATG ATC CAG GTC CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGG ACC TGG AGA TCA TTG TCA C
Mmi512453_top_Kcnj11	TGC TGT GGT CTT GCG CAC CAC CTG CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGC AGG TGG CGC AAG ACC A
Mmi512453_bot_Kcnj11	CCT GTG GTC TTG CGC CAC CTG CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGC AGG TGG TGC GCA AGA CCA C
Mmi512454_top_Kcnj11	TGC TGT TAC CAC CCA CGC CAT TCT CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGA GAA TGG TGG GTG GTA A
Mmi512454_bot_Kcnj11	CCT GTT ACC ACC CAC CAT TCT CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGA GAA TGG CGT GGG TGG TAA C
Mmi512455_top_Kcnj11	TGC TGT GCA CAA TGA GAA TGA GGA TGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CAT CCT CAC TCA TTG TGC A
Mmi512455_bot_Kcnj11	CCT GTG CAC AAT GAG TGA GGA TGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CAT CCT CAT TCT CAT TGT GCA C

Tabelle 17: Tabelle 18: Die (pre-)miRNA-Einzelstrang Sequenzen (*top* und *bottom*) zur Bindung an die mRNA der K_{ATP}-Kanal Untereinheiten, welche über das Gen Kcnj8 kodiert werden.

Primer Name	Sequenz
Mmi512488_top_Kcnj8	TGC TGT TGA CCA CCT GGA TGC GCA CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGT GCG CAC AGG TGG TCA A
Mmi512488_bot_Kcnj8	CCT GTT GAC CAC CTG TGC GCA CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGT GCG CAT CCA GGT GGT CAA C
Mmi512489_top_Kcnj8*	TGC TGT TGT GTG CCA GGT TGC AGG CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGC CTG CAC TGG CAC ACA A
Mmi512489_bot_Kcnj8*	TGC TGA AAT TCT GCA GCT TGC GGT AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CTA CCG CAC TGC AGA ATT T
Mmi512490_top_Kcnj8	TGC TGT GAA GAT GCA ACC CAA CAT GAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TCA TGT TGT TGC ATC TTC A
Mmi512490_bot_Kcnj8	CCT GTG AAG ATG CAA CAA CAT GAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TCA TGT TGG GTT GCA TCT TCA C
Mmi512491_top_Kcnj8	TGC TGT GAT GAT CAG ACC CAC GAT GTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC ACA TCG TGT CTG ATC ATC A
Mmi512491_bot_Kcnj8	CCT GTG ATG ATC AGA CAC GAT GTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC ACA TCG TGG GTC TGA TCA TCA C

Tabelle 19: Die (pre-)miRNA-Einzelstrang Sequenzen (*top* und *bottom*) zur Bindung an die mRNA der Kcnq2-Untereinheiten.

Primer Name	Sequenz
Mmi512536_top_Kcnq2**	TGC TGA AAT TCT GCA GCT TGC GGT AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CTA CCG CAC TGC AGA ATT T
Mmi512536_bot_Kcnq2**	CCT GAA ATT CTG CAG TGC GGT AGG TCA GTC AGT GGC CAA AAC CTA CCG CAA GCT GCA GAA TTT C
Mmi512537_top_Kcnq2*	TGC TGT ACC GAT CCC AAG AGC TTC CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGG AAG CTT GGG ATC GGT A
Mmi512537_bot_Kcnq2*	CCT GTA CCG ATC CCA AGC TTC CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGG AAG CTC TTG GGA TCG GTA C
Mmi512538_top_Kcnq2	TGC TGA GAT GTG GCA AAG ACA TTG CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGC AAT GTT TGC CAC ATC T
Mmi512538_bot_Kcnq2	CCT GAG ATG TGG CAA ACA TTG CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGC AAT GTC TTT GCC ACA TCT C
Mmi512539_top_Kcnq2	TGC TGA TAT CAA TCA CAC AGA ACG GCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GCC GTT CTG TGA TTG ATA T
Mmi512539_bot_Kcnq2	CCT GAT ATC AAT CAC AGA ACG GCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GCC GTT CTG TGT GAT TGA TAT C

Tabelle 20: Die miRNA-Einzelstrang Sequenzen (*top* und *bottom*) zur Bindung an die mRNA der Kcnq3-Untereinheiten.

Primer Name	Sequenz
Mmi503100_top_Kcnq3	TGC TGT ATT GTT TAA GCC AAC AGG CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGC CTG TTC TTA AAC AAT A
Mmi503100_bot_Kcnq3	CCT GTA TTG TTT AAG AAC AGG CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGC CTG TTG GCT TAA ACA ATA C
Mmi503101_top_Kcnq3	TGC TGA TTC CTT GGA GAC TGC TGG GAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TCC CAG CAC TCC AAG GAA T
Mmi503101_bot_Kcnq3	CCT GAT TCC TTG GAG TGC TGG GAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TCC CAG CAG TCT CCA AGG AAT C
Mmi503102_top_Kcnq3	TGC TGT GCT GAA GCC ACT TGG AGA CCG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GGT CTC CAT GGC TTC AGC A
Mmi503102_bot_Kcnq3	CCT GTG CTG AAG CCA TGG AGA CCG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GGT CTC CAA GTG GCT TCA GCA C
Mmi503103_top_Kcnq3	TGC TGC ACA GAG GCA ATC AGT ACG AAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TTC GTA CTT TGC CTC TGT G
Mmi503103_bot_Kcnq3	CCT GCA CAG AGG CAA AGT ACG AAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TTC GTA CTG ATT GCC TCT GTG C

VI. Literaturverzeichnis

- Abel, H. J., Lee, J. C., Callaway, J. C., & Foehring, R. C. (2004). Relationships between intracellular calcium and afterhyperpolarizations in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 91(1), 324-335.
- Aggleton, J. P. (2014). Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders. *Proc Biol Sci*, 281(1786).
- Akrouh, A., Halcomb, S. E., Nichols, C. G., & Sala-Rabanal, M. (2009). Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life*, 61(10), 971-978.
- Alger, B. E., & Nicoll, R. A. (1980). Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science*, 210(4474), 1122-1124.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335.
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, 163, 3-22.
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.
- Ambrogini, P., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Agostini, D., Bertini, L., Stocchi, V., . . . Cuppini, R. (2004). Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res*, 1017(1-2), 21-31.
- Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., & Jewell, D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 13(10), 807-818.
- Andersen, O. S., Koeppe, R. E., 2nd, & Roux, B. (2005). Gramicidin channels. *IEEE Trans Nanobioscience*, 4(1), 10-20.
- Andersen, P., Holmqvist, B., & Voorhoeve, P. E. (1966). Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol Scand*, 66(4), 448-460.
- Andersen, P., & Lømo, T. (1967). Control of hippocampal output by afferent volley frequency. *Prog Brain Res*, 27, 400-412.
- Andersen, P., Morris, R. G., Amaral, D. G., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Anderson, T. R., Huguenard, J. R., & Prince, D. A. (2010). Differential effects of Na⁺-K⁺ ATPase blockade on cortical layer V neurons. *J Physiol*, 588(Pt 22), 4401-4414.
- Andrade, R., & Aghajanian, G. K. (1984). Locus coeruleus activity in vitro: intrinsic regulation by a calcium-dependent potassium conductance but not alpha 2-adrenoceptors. *J Neurosci*, 4(1), 161-170.
- Andrade, R., Foehring, R. C., & Tzingounis, A. V. (2012). The calcium-activated slow AHP: cutting through the Gordian knot. *Front Cell Neurosci*, 6, 47.
- Andrade, R., & Nicoll, R. A. (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol*, 394, 99-124.
- Ang, C. W., Carlson, G. C., & Coulter, D. A. (2006). Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 26(46), 11850-11856.

- Aradi, I., & Holmes, W. R. (1999). Role of multiple calcium and calcium-dependent conductances in regulation of hippocampal dentate granule cell excitability. *J Comput Neurosci*, 6(3), 215-235.
- Arnberg, N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci*, 33(8), 442-448.
- Arruda, F., Cendes, F., Andermann, F., Dubeau, F., Villemure, J. G., Jones-Gotman, M. P., N., . . . Olivier, A. (1996). Mesial atrophy and outcome after amygdalohippocampectomy or temporal lobe removal. *Ann Neurol*, 40(3), 446-450.
- Awad, J. A., Johnson, R. A., Jakobs, K. H., & Schultz, G. (1983). Interactions of forskolin and adenylyl cyclase. Effects on substrate kinetics and protection against inactivation by heat and N-ethylmaleimide. *J Biol Chem*, 258(5), 2960-2965.
- Ball, M. J. (1977). Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol*, 37(2), 111-118.
- Barry, P. H. (1994). JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods*, 51(1), 107-116.
- Bast, T., & Feldon, J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol*, 70(4), 319-345.
- Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S. J., . . . Fakler, B. (1998). PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science*, 282(5391), 1141-1144.
- Bean, B. P. (1992). Whole-cell recording of calcium channel currents. *Methods Enzymol*, 207, 181-193.
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci*, 8(6), 451-465.
- Beck, H., Clusmann, H., Kral, T., Schramm, J., Heinemann, U., & Elger, C. E. (1997). Potassium currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol*, 498 (Pt 1), 73-85.
- Beguín, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gonoi, T., & Seino, S. (1999). PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J*, 18(17), 4722-4732.
- Behr, J., Gloveli, T., & Heinemann, U. (2000). Kindling induces a transient suppression of afterhyperpolarization in rat subicular neurons. *Brain Res*, 867(1-2), 259-264.
- Belousov, A. B., Godfraind, J. M., & Krnjevic, K. (1995). Internal Ca²⁺ stores involved in anoxic responses of rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 486 (Pt 3), 547-556.
- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S., & Hannon, G. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.
- Berron, D., Schutze, H., Maass, A., Cardenas-Blanco, A., Kuijf, H. J., Kumaran, D., & Duzel, E. (2016). Strong Evidence for Pattern Separation in Human Dentate Gyrus. *J Neurosci*, 36(29), 7569-7579.
- Bett, A. J., Prevec, L., & Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol*, 67(10), 5911-5921.
- Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., & Kaczmarek, L. K. (2003). Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. *J Neurosci*, 23(37), 11681-11691.
- Bhattacharjee, A., & Kaczmarek, L. K. (2005). For K⁺ channels, Na⁺ is the new Ca²⁺. *Trends Neurosci*, 28(8), 422-428.

- Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., & Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, 279(5349), 403-406.
- Bir, S. C., Ambekar, S., Kukreja, S., & Nanda, A. (2015). Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery. *J Neurosurg*, 122(4), 971-975.
- Blackstad, T. W., Brink, K., Hem, J., & Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol*, 138(4), 433-449.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2), 331-356.
- Bond, C. T., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1999). Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 370-378.
- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 21(1), 16-19.
- Bouilleret, V., Loup, F., Kiener, T., Marescaux, C., & Fritschy, J. M. (2000). Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 10(3), 305-324.
- Bourdeau, M. L., Morin, F., Laurent, C. E., Azzi, M., & Lacaille, J. C. (2007). Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 27(8), 1942-1953.
- Brenner, R., Chen, Q. H., Vilaythong, A., Toney, G. M., Noebels, J. L., & Aldrich, R. W. (2005). BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci*, 8(12), 1752-1759.
- Brewer, G. J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res*, 42(5), 674-683.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Met Ions Life Sci*, 12, 119-168.
- Brodal, A. (1947). The hippocampus and the sense of smell; a review. *Brain*, 70(Pt 2), 179-222.
- Brown, D. A., & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283(5748), 673-676.
- Brown, D. A., Marrion, N. V., & Smart, T. G. (1989). On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J Physiol*, 413, 469-488.
- Brown, D. A., & Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol*, 156(8), 1185-1195.
- Caillaud, C., Akli, S., Vigne, E., Koulakoff, A., Perricaudet, M., Poenaru, L., . . . Berwald-Netter, Y. (1993). Adenoviral vector as a gene delivery system into cultured rat neuronal and glial cells. *Eur J Neurosci*, 5(10), 1287-1291.
- Cajal, R. (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebretes*. Paris: A. Maloine.
- Campbell, S., & Macqueen, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci*, 29(6), 417-426.
- Cassell, M. D., & Brown, M. W. (1977). Cell counts for the stratum pyramidale of the hippocampus of the rat. *Life Sci*, 21(8), 1187-1191.
- Chamberlin, N. L., & Dingledine, R. (1989). Control of epileptiform burst rate by CA3 hippocampal cell afterhyperpolarizations in vitro. *Brain Res*, 492(1-2), 337-346.

- Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., & Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet*, 18(1), 53-55.
- Chawla, M. K., Guzowski, J. F., Ramirez-Amaya, V., Lipa, P., Hoffman, K. L., Marriott, L. K., . . . Barnes, C. A. (2005). Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*, 15(5), 579-586.
- Cherubini, E., & Lanfumey, L. (1987). A ouabain-sensitive hyperpolarization in rat striatal neurones in vitro. *Neurosci Lett*, 78(3), 338-342.
- Chesnoy, S., & Huang, L. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 27-47.
- Cho, E. S., Lee, S. Y., Park, J. Y., Hong, S. G., & Ryu, P. D. (2007). Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J Vet Sci*, 8(1), 15-20.
- Chung, I., Zhang, Y., Eubanks, J. H., & Zhang, L. (1998). Attenuation of hypoxic current by intracellular applications of ATP regenerating agents in hippocampal CA1 neurons of rat brain slices. *Neuroscience*, 86(4), 1101-1107.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 302(2), 206-219.
- Collins, R. C., Tarse, R. G., & Lothman, E. W. (1983). Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res*, 280(1), 25-40.
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 153-160.
- Coulter, D. A. (2000). Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered "epileptic" gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells. *Epilepsia*, 41 Suppl 6, S96-99.
- Covolán, L., Ribeiro, L. T., Longo, B. M., & Mello, L. E. (2000). Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus*, 10(2), 169-180.
- Davidson, B. L., Allen, E. D., Kozarsky, K. F., Wilson, J. M., & Roessler, B. J. (1993). A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet*, 3(3), 219-223.
- de Almeida, L., Idiart, M., & Lisman, J. E. (2009). The input-output transformation of the hippocampal granule cells: from grid cells to place fields. *J Neurosci*, 29(23), 7504-7512.
- de Kloet, E. R. (1999). Neurobiology of adaptation disorders. *Acta Neuropsychiatr*, 11(1), 11-14.
- de Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Williamson, A., Spencer, S. S., Zaveri, H. P., Eid, T., & Spencer, D. D. (2003). A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories. *Epilepsia*, 44(5), 677-687.
- de los Angeles Tejada, M., Jensen, L. J., & Klaerke, D. A. (2012). PIP(2) modulation of Slick and Slack K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(2), 208-213.
- del Rio, J. A., Heimrich, B., Soriano, E., Schwegler, H., & Frotscher, M. (1991). Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*, 43(2-3), 335-347.
- Delmas, P., & Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci*, 6(11), 850-862.

- Dietrich, D., Clusmann, H., Kral, T., Steinhauser, C., Blumcke, I., Heinemann, U., & Schramm, J. (1999). Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus. *Neuroscience*, 90(4), 1197-1206.
- Dietrich, D., Podlogar, M., Ortmanns, G., Clusmann, H., & Kral, T. (2005). Calbindin-D28k content and firing pattern of hippocampal granule cells in amygdala-kindled rats: a perforated patch-clamp study. *Brain Res*, 1032(1-2), 123-130.
- Disterhoft, J. F., & Oh, M. M. (2006). Pharmacological and molecular enhancement of learning in aging and Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*, 99(2-3), 180-192.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., . . . MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Dryer, S. E. (1994). Na⁺-activated K⁺ channels: a new family of large-conductance ion channels. *Trends Neurosci*, 17(4), 155-160.
- Du, J., & Bradley, R. M. (1996). Electrophysiological and morphological properties of neurons acutely isolated from the rostral gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract. *Chem Senses*, 21(6), 729-737.
- Dudek, F. E., & Shao, L. R. (2003). Loss of GABAergic Interneurons in Seizure-induced Epileptogenesis. *Epilepsy Curr*, 3(5), 159-161.
- Dudek, F. E., & Shao, L. R. (2004). Mossy fiber sprouting and recurrent excitation: direct electrophysiologic evidence and potential implications. *Epilepsy Curr*, 4(5), 184-187.
- Dutar, P., & Nicoll, R. A. (1988). Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems: electrophysiological studies in vitro. *J. Neurosci*, 8, 4214-4224.
- Ekstrom, A. D., Kahana, M. J., Caplan, J. B., Fields, T. A., Isham, E. A., Newman, E. L., & Fried, I. (2003). Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature*, 425(6954), 184-188.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188-200.
- Empson, R. M., & Jefferys, J. G. (2001). Ca²⁺ entry through L-type Ca²⁺ channels helps terminate epileptiform activity by activation of a Ca²⁺ dependent afterhyperpolarisation in hippocampal CA3. *Neuroscience*, 102(2), 297-306.
- Engin, E., & Treit, D. (2007). The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol*, 18(5-6), 365-374.
- Erdemli, G., & Krnjevic, K. (1994). Tolbutamide suppresses slow and medium afterhyperpolarization in hippocampal slices. *Neuroreport*, 5(16), 2145-2148.
- Faber, E. S., & Sah, P. (2002). Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J Neurosci*, 22(5), 1618-1628.
- Fakler, B., & Adelman, J. P. (2008). Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron*, 59(6), 873-881.
- Fernandez de Sevilla, D., Garduno, J., Galvan, E., & Buno, W. (2006). Calcium-activated afterhyperpolarizations regulate synchronization and timing of epileptiform bursts in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 96(6), 3028-3041.
- Fisahn, A., Heinemann, S. F., & McBain, C. J. (2005). The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *J Physiol*, 562(Pt 1), 199-203.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., . . . Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.

- Fleidervish, I. A., Friedman, A., & Gutnick, M. J. (1996). Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *J Physiol*, 493 (Pt 1), 83-97.
- Foehring, R. C., Schwindt, P. C., & Crill, W. E. (1989). Norepinephrine selectively reduces slow Ca²⁺- and Na⁺-mediated K⁺ currents in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 61(2), 245-256.
- Ford, K. J., Arroyo, D. A., Kay, J. N., Lloyd, E. E., Bryan, R. M., Jr., Sanes, J. R., & Feller, M. B. (2013). A role for TREK1 in generating the slow afterhyperpolarization in developing starburst amacrine cells. *J Neurophysiol*, 109(9), 2250-2259.
- Franceschetti, S., Lavazza, T., Curia, G., Aracri, P., Panzica, F., Sancini, G., . . . Magistretti, J. (2003). Na⁺-activated K⁺ current contributes to postexcitatory hyperpolarization in neocortical intrinsically bursting neurons. *J Neurophysiol*, 89(4), 2101-2111.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., & Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23(28), 9357-9366.
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, 305(5688), 1258-1264.
- Gamper, N., & Shapiro, M. S. (2003). Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 122(1), 17-31.
- Gant, J. C., Chen, K. C., Kadish, I., Blalock, E. M., Thibault, O., Porter, N. M., & Landfield, P. W. (2015). Reversal of Aging-Related Neuronal Ca²⁺ Dysregulation and Cognitive Impairment by Delivery of a Transgene Encoding FK506-Binding Protein 12.6/1b to the Hippocampus. *J Neurosci*, 35(30), 10878-10887.
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., & Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7(11), 1233-1241.
- Gerlach, A. C., Maylie, J., & Adelman, J. P. (2004). Activation kinetics of the slow afterhyperpolarization in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch*, 448(2), 187-196.
- Giesing, M., Neumann, G., Egge, H., & Zilliken, F. (1975). Lipid metabolism of developing central nervous tissues in organotypic cultures. I. Lipid distribution and fatty acid profiles of the medium for rat brain cortex in vitro. *Nutr Metab*, 19(5-6), 242-250.
- Glitsch, H. G. (2001). Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol Rev*, 81(4), 1791-1826.
- Goaillard, J. M., & Vincent, P. (2002). Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline thalamic neurones by activating 5-HT(7) receptors. *J Physiol*, 541(Pt 2), 453-465.
- Godfraind, J. M., & Krnjevic, K. (1993). Tolbutamide suppresses anoxic outward current of hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 162(1-2), 101-104.
- Gorman, A. L., & Marmor, M. F. (1974). Long-term effect of ouabain and sodium pump inhibition on a neuronal membrane. *J Physiol*, 242(1), 49-60.
- Gothelf, D., Soreni, N., Nachman, R. P., Tyano, S., Hiss, Y., Reiner, O., & Weizman, A. (2000). Evidence for the involvement of the hippocampus in the pathophysiology of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10(5), 389-395.
- Grellier, E., Lecolle, K., Rogee, S., Couturier, C., D'Halluin, J. C., Hong, S. S., . . . Colin, M. (2011). A fiber-modified adenoviral vector interacts with immunoevasion

- molecules of the B7 family at the surface of murine leukemia cells derived from dormant tumors. *Mol Cancer*, 10, 105.
- Gribkoff, V. K. (2003). The therapeutic potential of neuronal KCNQ channel modulators. *Expert Opin Ther Targets*, 7(6), 737-748.
- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H., & Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 566(Pt 3), 689-715.
- Gulledge, A. T., Dasari, S., Onoue, K., Stephens, E. K., Hasse, J. M., & Avesar, D. (2013). A sodium-pump-mediated afterhyperpolarization in pyramidal neurons. *J Neurosci*, 33(32), 13025-13041.
- Gupta, A., Elgammal, F. S., Proddutur, A., Shah, S., & Santhakumar, V. (2012). Decrease in tonic inhibition contributes to increase in dentate semilunar granule cell excitability after brain injury. *J Neurosci*, 32(7), 2523-2537.
- Haas, C. A., & Frotscher, M. (2010). Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp Brain Res*, 200(2), 141-149.
- Haas, H. L., & Konnerth, A. (1983). Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 302(5907), 432-434.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801-806.
- Hage, T. A., & Salkoff, L. (2012). Sodium-activated potassium channels are functionally coupled to persistent sodium currents. *J Neurosci*, 32(8), 2714-2721.
- Hailer, N. P., Jarhult, J. D., & Nitsch, R. (1996). Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia*, 18(4), 319-331.
- Halls, M. L., & Cooper, D. M. (2017). Adenylyl cyclase signalling complexes - Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacol Ther*.
- Hanck, D. A., Nikitina, E., McNulty, M. M., Fozzard, H. A., Lipkind, G. M., & Sheets, M. F. (2009). Using lidocaine and benzocaine to link sodium channel molecular conformations to state-dependent antiarrhythmic drug affinity. *Circ Res*, 105(5), 492-499.
- Hansen, S. B., Tao, X., & MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*, 477(7365), 495-498.
- Harris, J. A., & Murphy, J. A. (2011). Retigabine (ezogabine) as add-on therapy for partial-onset seizures: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis*, 2(6), 371-376.
- Hayes, M. E., Drummond, D. C., Kirpotin, D. B., Zheng, W. W., Noble, C. O., Park, J. W., . . . Hong, K. (2006). Genospheres: self-assembling nucleic acid-lipid nanoparticles suitable for targeted gene delivery. *Gene Ther*, 13(7), 646-651.
- Hayes, S. M., Fortier, C. B., Levine, A., Milberg, W. P., & McGlinchey, R. (2012). Implicit memory in Korsakoff's syndrome: a review of procedural learning and priming studies. *Neuropsychol Rev*, 22(2), 132-153.
- Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J. P., Ficker, E., Stabel, J., & Zhang, C. L. (1992). The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 273-280.
- Heinrich, C., Nitta, N., Flubacher, A., Muller, M., Fahrner, A., Kirsch, M., . . . Haas, C. A. (2006). Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci*, 26(17), 4701-4713.

- Henze, D. A., Wittner, L., & Buzsaki, G. (2002). Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci*, 5(8), 790-795.
- Hester, M. S., & Danzer, S. C. (2014). Hippocampal granule cell pathology in epilepsy - a possible structural basis for comorbidities of epilepsy? *Epilepsy Behav*, 38, 105-116.
- Higgs, M. H., & Spain, W. J. (2011). Kv1 channels control spike threshold dynamics and spike timing in cortical pyramidal neurones. *J Physiol*, 589(Pt 21), 5125-5142.
- Hildebrandt, S., Schmidt, A., Stoll, A., Schmitt, O., Kohling, R., Wree, A., . . . Putzer, B. M. (2010). Targeting of neural stem cells in the hippocampus of adult rats by custom-made Ad vectors. *Brain Struct Funct*, 215(2), 105-113.
- Hille, B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol*, 69(4), 497-515.
- Hitt, M. M., Addison, C. L., & Graham, F. L. (1997). Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol*, 40, 137-206.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*, 116(4), 424-448.
- Hodgkin, A. L., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, 108(1), 37-77.
- Honore, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D., & Nielsen, F. E. (1988). Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science*, 241(4866), 701-703.
- Hotson, J. R., & Prince, D. A. (1980). A calcium-activated hyperpolarization follows repetitive firing in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 43(2), 409-419.
- Houser, C. R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*, 535(2), 195-204.
- Houser, C. R. (1992). Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 223-234.
- Hsu, D. (2007). The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead. *Prog Brain Res*, 163, 601-613.
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305, 86-98.
- Hund, T. J., & Mohler, P. J. (2011). Differential roles for SUR subunits in KATP channel membrane targeting and regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(1), H33-35.
- Huxley, A. F., & Stampfli, R. (1951). Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibers. *J Physiol*, 112(3-4), 496-508.
- Igelstrom, K. M. (2013). Is slack an intrinsic seizure terminator? *Neuroscientist*, 19(3), 248-254.
- Isokawa, M., Avanzini, G., Finch, D. M., Babb, T. L., & Levesque, M. F. (1991). Physiologic properties of human dentate granule cells in slices prepared from epileptic patients. *Epilepsy Res*, 9(3), 242-250.
- Isokawa, M., & Fried, I. (1996). Extracellular slow negative transient in the dentate gyrus of human epileptic hippocampus in vitro. *Neuroscience*, 72(1), 31-37.
- Izquierdo, I., Cammarota, M., Da Silva, W. C., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., . . . Medina, J. H. (2008). The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *An Acad Bras Cienc*, 80(1), 115-127.
- Jackson, M. B., & Scharfman, H. E. (1996). Positive feedback from hilar mossy cells to granule cells in the dentate gyrus revealed by voltage-sensitive dye and microelectrode recording. *J Neurophysiol*, 76(1), 601-616.

- Jeffs, G. J., Meloni, B. P., Bakker, A. J., & Knuckey, N. W. (2007). The role of the Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) in neurons following ischaemia. *J Clin Neurosci*, 14(6), 507-514.
- Jensen, H. S., Grunnet, M., & Olesen, S. P. (2007). Inactivation as a new regulatory mechanism for neuronal Kv7 channels. *Biophys J*, 92(8), 2747-2756.
- Jinde, S., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Pickel, J., Kohno, K., . . . Nakazawa, K. (2012). Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron*, 76(6), 1189-1200.
- Jonakait, G. M., Schotland, S., & Ni, L. (1988). Development of serotonin, substance P and thyrotrophin-releasing hormone in mouse medullary raphe grown in organotypic tissue culture: developmental regulation by serotonin. *Brain Res*, 473(2), 336-343.
- Jung, M. W., & McNaughton, B. L. (1993). Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*, 3(2), 165-182.
- Kaczmarek, L. K. (2013). Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN Neurosci*, 2013(2013).
- Kalappa, B. I., Soh, H., Duignan, K. M., Furuya, T., Edwards, S., Tzingounis, A. V., & Tzounopoulos, T. (2015). Potent KCNQ2/3-specific channel activator suppresses in vivo epileptic activity and prevents the development of tinnitus. *J Neurosci*, 35(23), 8829-8842.
- Kamal, A., Artola, A., Biessels, G. J., Gispen, W. H., & Ramakers, G. M. (2003). Increased spike broadening and slow afterhyperpolarization in CA1 pyramidal cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience*, 118(2), 577-583.
- Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H., & Irisawa, H. (1984). Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*, 309(5966), 354-356.
- Kampa, B. M., Letzkus, J. J., & Stuart, G. J. (2006). Requirement of dendritic calcium spikes for induction of spike-timing-dependent synaptic plasticity. *J Physiol*, 574(Pt 1), 283-290.
- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092-1094.
- Kasparov, S., Teschemacher, A. G., & Paton, J. F. (2002). Dynamic confocal imaging in acute brain slices and organotypic slice cultures using a spectral confocal microscope with single photon excitation. *Exp Physiol*, 87(6), 715-724.
- Kato, M., Tanaka, N., Usui, S., & Sakuma, Y. (2006). The SK channel blocker apamin inhibits slow afterhyperpolarization currents in rat gonadotropin-releasing hormone neurones. *J Physiol*, 574(Pt 2), 431-442.
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 531-556.
- Kawasaki, H., & Taira, K. (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 431(7005), 211-217.
- Kay, A. R. (1992). An intracellular medium formulary. *J Neurosci Methods*, 44(2-3), 91-100.
- Kesner, R. P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res*, 163, 567-576.
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 48, 92-147.
- Kim, K. S., Duignan, K. M., Hawryluk, J. M., Soh, H., & Tzingounis, A. V. (2016). The Voltage Activation of Cortical KCNQ Channels Depends on Global PIP2 Levels. *Biophys J*, 110(5), 1089-1098.

- Kim, K. S., Kobayashi, M., Takamatsu, K., & Tzingounis, A. V. (2012). Hippocalcin and KCNQ channels contribute to the kinetics of the slow afterhyperpolarization. *Biophys J*, 103(12), 2446-2454.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397(8), 3173-3178.
- Kim, U., & McCormick, D. A. (1998). Functional and ionic properties of a slow afterhyperpolarization in ferret perigeniculate neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 80(3), 1222-1235.
- Kimm, T., Khaliq, Z. M., & Bean, B. P. (2015). Differential Regulation of Action Potential Shape and Burst-Frequency Firing by BK and Kv2 Channels in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci*, 35(50), 16404-16417.
- Kirchheim, F., Tinnes, S., Haas, C. A., Stegen, M., & Wolfart, J. (2013). Regulation of action potential delays via voltage-gated potassium Kv1.1 channels in dentate granule cells during hippocampal epilepsy. *Front Cell Neurosci*, 7, 248.
- Kobayashi, M., & Buckmaster, P. S. (2003). Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 23(6), 2440-2452.
- Köhling, R., & Wolfart, J. (2016). Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(5).
- Kolaj, M., Zhang, L., Ronnekleiv, O. K., & Renaud, L. P. (2012). Midline thalamic paraventricular nucleus neurons display diurnal variation in resting membrane potentials, conductances, and firing patterns in vitro. *J Neurophysiol*, 107(7), 1835-1844.
- Konrad, C., Ukas, T., Nebel, C., Arolt, V., Toga, A. W., & Narr, K. L. (2009). Defining the human hippocampus in cerebral magnetic resonance images--an overview of current segmentation protocols. *Neuroimage*, 47(4), 1185-1195.
- Koster, J. C., Sha, Q., & Nichols, C. G. (1999). Sulfonylurea and K(+) -channel opener sensitivity of K(ATP) channels. Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits. *J Gen Physiol*, 114(2), 203-213.
- Kowalski, J., Gan, J., Jonas, P., & Pernia-Andrade, A. J. (2016). Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern in vivo in anesthetized rats. *Hippocampus*, 26(5), 668-682.
- Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Bui, A., Lew, S., Oijala, M., & Soltesz, I. (2015). In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *J Physiol*, 593(10), 2379-2388.
- Kropff, E., Yang, S. M., & Schinder, A. F. (2015). Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Curr Opin Neurobiol*, 35, 21-26.
- Krueppel, R., Remy, S., & Beck, H. (2011). Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells. *Neuron*, 71(3), 512-528.
- Kugler, S., Kilic, E., & Bahr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther*, 10(4), 337-347.
- Kugler, S., Meyn, L., Holzmüller, H., Gerhardt, E., Isenmann, S., Schulz, J. B., & Bahr, M. (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Mol Cell Neurosci*, 17(1), 78-96.
- Kyrozis, A., & Reichling, D. B. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J Neurosci Methods*, 57(1), 27-35.
- Lambert, J. D., & Jones, R. S. (1990). A reevaluation of excitatory amino acid-mediated synaptic transmission in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 64(1), 119-132.

- Lancaster, B., & Adams, P. R. (1986). Calcium-dependent current generating the afterhyperpolarization of hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 55(6), 1268-1282.
- Lancaster, B., Hu, H., Gibb, B., & Storm, J. F. (2006). Kinetics of ion channel modulation by cAMP in rat hippocampal neurones. *J Physiol*, 576(Pt 2), 403-417.
- Lancaster, B., & Nicoll, R. A. (1987). Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol*, 389, 187-203.
- Landfield, P. W., & Pitler, T. A. (1984). Prolonged Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science*, 226(4678), 1089-1092.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, 58, 913-949.
- Larsson, O., Ammala, C., Bokvist, K., Fredholm, B., & Rorsman, P. (1993). Stimulation of the KATP channel by ADP and diazoxide requires nucleotide hydrolysis in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol*, 463, 349-365.
- Lee, C. H., & Ruben, P. C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin)*, 2(6), 407-412.
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus*, 14(1), 66-76.
- Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L., & Perez-Reyes, E. (1999). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha 1\text{H}$. *Biophys J*, 77(6), 3034-3042.
- Lee, K., Duan, W., Sneyd, J., & Herbison, A. E. (2010). Two slow calcium-activated afterhyperpolarization currents control burst firing dynamics in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*, 30(18), 6214-6224.
- Lerche, H., Biervert, C., Alekov, A. K., Schleithoff, L., Lindner, M., Klinger, W., . . . Steinlein, O. K. (1999). A reduced K^{+} current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol*, 46(3), 305-312.
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814), 961-966.
- Lewis, T. B., Glasgow, J. N., Glandon, A. M., Curiel, D. T., & Standaert, D. G. (2010). Transduction of brain dopamine neurons by adenoviral vectors is modulated by CAR expression: rationale for tropism modified vectors in PD gene therapy. *PLoS One*, 5(9).
- Liebmann, L., Karst, H., Sidiropoulou, K., van Gemert, N., Meijer, O. C., Poirazi, P., & Joels, M. (2008). Differential effects of corticosterone on the slow afterhyperpolarization in the basolateral amygdala and CA1 region: possible role of calcium channel subunits. *J Neurophysiol*, 99(2), 958-968.
- Lin, Y. F., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2000). Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *EMBO J*, 19(5), 942-955.
- Ling, G., & Gerard, R. W. (1949). The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J Cell Physiol*, 34(3), 383-396.
- Lirk, P., Poroli, M., Rigaud, M., Fuchs, A., Fillip, P., Huang, C. Y., . . . Hogan, Q. (2008). Modulators of calcium influx regulate membrane excitability in rat dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg*, 107(2), 673-685.
- Lisman, J. E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci*, 20(1), 38-43.

- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P. T., Puryear, C. B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, 484(7394), 381-385.
- Liu, X., Tilwalli, S., Ye, G., Lio, P. A., Pasternak, J. F., & Trommer, B. L. (2000). Morphologic and electrophysiologic maturation in developing dentate gyrus granule cells. *Brain Res*, 856(1-2), 202-212.
- Lomo, T. (1966). Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol. Scand*, 68, 277, 128.
- Lomo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432), 617-620.
- Lothman, E. W., Stringer, J. L., & Bertram, E. H. (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 301-313.
- Loup, F., Wieser, H. G., Yonekawa, Y., Aguzzi, A., & Fritschy, J. M. (2000). Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 20(14), 5401-5419.
- Luebke, J. I., & Amatruddo, J. M. (2012). Age-related increase of sI(AHP) in prefrontal pyramidal cells of monkeys: relationship to cognition. *Neurobiol Aging*, 33(6), 1085-1095.
- Lutschg, V., Boucke, K., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2011). Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithelial cells. *Nat Commun*, 2, 391.
- Ma, W., Berg, J., & Yellen, G. (2007). Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *J Neurosci*, 27(14), 3618-3625.
- Madison, D. V., & Nicoll, R. A. (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol*, 354, 319-331.
- Madison, D. V., & Nicoll, R. A. (1986). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate mediates beta-receptor actions of noradrenaline in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 372, 245-259.
- Magloczky, Z., & Freund, T. F. (2005). Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci*, 28(6), 334-340.
- Magloczky, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S., & Freund, T. F. (1997). Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 76(2), 377-385.
- Main, M. J., Cryan, J. E., Dupere, J. R., Cox, B., Clare, J. J., & Burbidge, S. A. (2000). Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol*, 58(2), 253-262.
- Margerison, J. H., & Corsellis, J. A. (1966). Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*, 89(3), 499-530.
- Marrion, N. V., & Tavalin, S. J. (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*, 395(6705), 900-905.
- Martin, E. D., Araque, A., & Buno, W. (2001). Synaptic regulation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol*, 86(6), 2878-2886.
- Martin, S. J., & Morris, R. G. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12(5), 609-636.
- Martinez-Pinna, J., Davies, P. J., & McLachlan, E. M. (2000). Diversity of channels involved in Ca(2+) activation of K(+) channels during the prolonged AHP in guinea-pig sympathetic neurons. *J Neurophysiol*, 84(3), 1346-1354.

- Martinez-Sanchez, M., Strigrow, F., Schroder, U. H., Kahlert, S., Reymann, K. G., & Reiser, G. (2004). Na(+) and Ca(2+) homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience*, 128(4), 729-740.
- Mateos-Aparicio, P., Murphy, R., & Storm, J. F. (2014). Complementary functions of SK and Kv7/M potassium channels in excitability control and synaptic integration in rat hippocampal dentate granule cells. *J Physiol*, 592(4), 669-693.
- McCleskey, E. W., Fox, A. P., Feldman, D., & Tsien, R. W. (1986). Different types of calcium channels. *J Exp Biol*, 124, 177-190.
- McCormick, D. A., & Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol*, 63, 815-846.
- McCormick, D. A., & Huguenard, J. R. (1992). A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol*, 68(4), 1384-1400.
- McCormick, D. A., & Prince, D. A. (1988). Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, in vitro. *J Neurophysiol*, 59(3), 978-996.
- McDermott, C. M., & Schrader, L. A. (2011). Activation of kappa opioid receptors increases intrinsic excitability of dentate gyrus granule cells. *J Physiol*, 589(Pt 14), 3517-3532.
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., . . . Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, 317(5834), 94-99.
- McKillen, H. C., Davies, N. W., Stanfield, P. R., & Standen, N. B. (1994). The effect of intracellular anions on ATP-dependent potassium channels of rat skeletal muscle. *J Physiol*, 479 (Pt 3), 341-351.
- McNay, E. C., Williamson, A., McCrimmon, R. J., & Sherwin, R. S. (2006). Cognitive and neural hippocampal effects of long-term moderate recurrent hypoglycemia. *Diabetes*, 55(4), 1088-1095.
- McQuillin, A., Murray, K. D., Etheridge, C. J., Stewart, L., Cooper, R. G., Brett, P. M., . . . Gurling, H. M. (1997). Optimization of liposome mediated transfection of a neuronal cell line. *Neuroreport*, 8(6), 1481-1484.
- Mehranfard, N., Gholamipour-Badie, H., Motamedi, F., Janahmadi, M., & Naderi, N. (2014). The effect of paxilline on early alterations of electrophysiological properties of dentate gyrus granule cells in pilocarpine-treated rats. *Iran J Pharm Res*, 13(Suppl), 125-132.
- Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Pretorius, J. K., Babb, T. L., & Finch, D. M. (1992). Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*, 9, 51-59; discussion 59-60.
- Melyan, Z., Wheal, H. V., & Lancaster, B. (2002). Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron*, 34(1), 107-114.
- Mhyre, A. J., Marcondes, A. M., Spaulding, E. Y., & Deeg, H. J. (2009). Stroma-dependent apoptosis in clonal hematopoietic precursors correlates with expression of PYCARD. *Blood*, 113(3), 649-658.
- Miceli, F., Soldovieri, M. V., Martire, M., & Tagliatela, M. (2008). Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr Opin Pharmacol*, 8(1), 65-74.
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*, 1(4), REVIEWS0004.
- Miyaguchi, K., Maeda, Y., Collin, C., & Sihag, R. K. (2000). Gene transfer into hippocampal slice cultures with an adenovirus vector driven by cytomegalovirus

- promoter: stable co-expression of green fluorescent protein and lacZ genes. *Brain Res Bull*, 51(3), 195-202.
- Molinoff, P. B. (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs*, 28 Suppl 2, 1-15.
- Molnar, P., & Nadler, J. V. (1999). Mossy fiber-granule cell synapses in the normal and epileptic rat dentate gyrus studied with minimal laser photostimulation. *J Neurophysiol*, 82(4), 1883-1894.
- Mongiat, L. A., Esposito, M. S., Lombardi, G., & Schinder, A. F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One*, 4(4), e5320.
- Moore, K. A., Cohen, A. S., Kao, J. P., & Weinreich, D. (1998). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediates a slow post-spike hyperpolarization in rabbit vagal afferent neurons. *J Neurophysiol*, 79(2), 688-694.
- Mortimer, I., Tam, P., MacLachlan, I., Graham, R. W., Saravolac, E. G., & Joshi, P. B. (1999). Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther*, 6(3), 403-411.
- Moyer, J. R., Jr., Power, J. M., Thompson, L. T., & Disterhoft, J. F. (2000). Increased excitability of aged rabbit CA1 neurons after trace eyeblink conditioning. *J Neurosci*, 20(14), 5476-5482.
- Moyer, J. R., Jr., Thompson, L. T., Black, J. P., & Disterhoft, J. F. (1992). Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. *J Neurophysiol*, 68(6), 2100-2109.
- Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P. E., Bureau, I., . . . Heinemann, S. F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, 392(6676), 601-605.
- Muller, D., Buchs, P. A., & Stoppini, L. (1993). Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res*, 71(1), 93-100.
- Murray, K. D., McQuillin, A., Stewart, L., Etheridge, C. J., Cooper, R. G., Miller, A. D., & Gurling, H. M. (1999). Cationic liposome-mediated DNA transfection in organotypic explant cultures of the ventral mesencephalon. *Gene Ther*, 6(2), 190-197.
- Myers, C. E., & Scharfman, H. E. (2009). A role for hilar cells in pattern separation in the dentate gyrus: a computational approach. *Hippocampus*, 19(4), 321-337.
- Nadel, L. (1991). The hippocampus and space revisited. *Hippocampus*, 1(3), 221-229.
- Nakajima, T., Sugimoto, T., & Kurachi, Y. (1992). Effects of anions on the G protein-mediated activation of the muscarinic K⁺ channel in the cardiac atrial cell membrane. Intracellular chloride inhibition of the GTPase activity of GK. *J Gen Physiol*, 99(5), 665-682.
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., . . . Tonegawa, S. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149(1), 188-201.
- Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol*, 207, 123-131.
- Neher, E. (1998). Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca⁺⁺ signals. *Cell Calcium*, 24(5-6), 345-357.
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799-802.
- Nenov, M. N., Tempia, F., Denner, L., Dineley, K. T., & Laezza, F. (2015). Impaired firing properties of dentate granule neurons in an Alzheimer's disease animal model are rescued by PPARgamma agonism. *J Neurophysiol*, 113(6), 1712-1726.

- Neunuebel, J. P., & Knierim, J. J. (2014). CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81(2), 416-427.
- Nikonenko, A. G., Radenovic, L., Andjus, P. R., & Skibo, G. G. (2009). Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *Anat Rec (Hoboken)*, 292(12), 1914-1921.
- Nishijo, H., Ono, T., & Nishino, H. (1988). Single neuron responses in amygdala of alert monkey during complex sensory stimulation with affective significance. *J Neurosci*, 8(10), 3570-3583.
- North, R. A. (1973). The calcium-dependent slow after-hyperpolarization in myenteric plexus neurones with tetrodotoxin-resistant action potentials. *Br J Pharmacol*, 49(4), 709-711.
- Nusser, Z., Hajos, N., Somogyi, P., & Mody, I. (1998). Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, 395(6698), 172-177.
- Nuwer, M. O., Picchione, K. E., & Bhattacharjee, A. (2010). PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *J Neurosci*, 30(42), 14165-14172.
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*, 51(1), 78-109.
- O'Keefe, J., & Bouma, H. (1969). Complex sensory properties of certain amygdala units in the freely moving cat. *Exp Neurol*, 23(3), 384-398.
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34(1), 171-175.
- O'Reilly, R. C., & McClelland, J. L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6), 661-682.
- Okazaki, M. M., Molnar, P., & Nadler, J. V. (1999). Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *J Neurophysiol*, 81(4), 1645-1660.
- Olschewski, A., Brau, M. E., Olschewski, H., Hempelmann, G., & Vogel, W. (1996). ATP-dependent potassium channel in rat cardiomyocytes is blocked by lidocaine. Possible impact on the antiarrhythmic action of lidocaine. *Circulation*, 93(4), 656-659.
- Orcinha, C., Munzner, G., Gerlach, J., Kiliyas, A., Follo, M., Egert, U., & Haas, C. A. (2016). Seizure-Induced Motility of Differentiated Dentate Granule Cells Is Prevented by the Central Reelin Fragment. *Front Cell Neurosci*, 10, 183.
- Otto, J. F., Yang, Y., Frankel, W. N., White, H. S., & Wilcox, K. S. (2006). A spontaneous mutation involving Kcnq2 (Kv7.2) reduces M-current density and spike frequency adaptation in mouse CA1 neurons. *J Neurosci*, 26(7), 2053-2059.
- Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2015). Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 108-119.
- Palty, R., Hershfinkel, M., & Sekler, I. (2012). Molecular identity and functional properties of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*, 287(38), 31650-31657.
- Papez, J. (1995). A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1995 Winter, 7(1), 103-112.
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., & Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17(10), 3727-3738.

- Parker, D., Hill, R., & Grillner, S. (1996). Electrogenic pump and a Ca^{2+} -dependent K^{+} conductance contribute to a posttetanic hyperpolarization in lamprey sensory neurons. *J Neurophysiol*, 76(1), 540-553.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., & Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313(5790), 1141-1144.
- Paulsen, O., & Sejnowski, T. J. (2000). Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 10(2), 172-179.
- Pedarzani, P., Mosbacher, J., Rivard, A., Cingolani, L. A., Oliver, D., Stocker, M., . . . Fakler, B. (2001). Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J Biol Chem*, 276(13), 9762-9769.
- Pedarzani, P., & Storm, J. F. (1993). PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K^{+} current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron*, 11(6), 1023-1035.
- Pedarzani, P., & Storm, J. F. (1995). Dopamine modulates the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current IAHP via cyclic AMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 74(6), 2749-2753.
- Pelletier, M. R., Pahapill, P. A., Pennefather, P. S., & Carlen, P. L. (2000). Analysis of single $\text{K}(\text{ATP})$ channels in mammalian dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol*, 84(5), 2291-2301.
- Penttonen, M., Kamondi, A., Sik, A., Acsády, L., & Buzsáki, G. (1997). Feed-forward and feed-back activation of the dentate gyrus in vivo during dentate spikes and sharp wave bursts. *Hippocampus*, 7(4), 437-450.
- Pernia-Andrade, A. J., & Jonas, P. (2014). Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations. *Neuron*, 81(1), 140-152.
- Peron, S. P., & Gabbiani, F. (2009). Role of spike-frequency adaptation in shaping neuronal response to dynamic stimuli. *Biol Cybern*, 100(6), 505-520.
- Piccolino, M. (2000). The bicentennial of the Voltaic battery (1800-2000): the artificial electric organ. *Trends Neurosci*, 23(4), 147-151.
- Pike, F. G., Meredith, R. M., Olding, A. W., & Paulsen, O. (1999). Rapid report: postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J Physiol*, 518 (Pt 2), 571-576.
- Pineda, J. C., Waters, R. S., & Foehring, R. C. (1998). Specificity in the interaction of HVA Ca^{2+} channel types with Ca^{2+} -dependent AHPs and firing behavior in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 79(5), 2522-2534.
- Podlogar, M., & Dietrich, D. (2006). Firing pattern of rat hippocampal neurons: a perforated patch clamp study. *Brain Res*, 1085(1), 95-101.
- Power, J. M., Wu, W. W., Sametsky, E., Oh, M. M., & Disterhoft, J. F. (2002). Age-related enhancement of the slow outward calcium-activated potassium current in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *J Neurosci*, 22(16), 7234-7243.
- Radulescu, A. R. (2010). Mechanisms explaining transitions between tonic and phasic firing in neuronal populations as predicted by a low dimensional firing rate model. *PLoS One*, 5(9), e12695.
- Ramirez, S., Tonegawa, S., & Liu, X. (2013). Identification and optogenetic manipulation of memory engrams in the hippocampus. *Front Behav Neurosci*, 7, 226.
- Ribak, C. E. (1992). Local circuitry of GABAergic basket cells in the dentate gyrus. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 29-47.

- Ribak, C. E., & Seress, L. (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 12(4), 577-597.
- Riban, V., Bouilleret, V., Pham-Le, B. T., Fritschy, J. M., Marescaux, C., & Depaulis, A. (2002). Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 112(1), 101-111.
- Ridoux, V., Robert, J., Perricaudet, M., Mallet, J., & Le Gal La Salle, G. (1995). Adenovirus mediated gene transfer in organotypic brain slices. *Neurobiol Dis*, 2(1), 49-54.
- Robert, J. J., Bouilleret, V., Ridoux, V., Valin, A., Geoffroy, M. C., Mallet, J., & Le Gal La Salle, G. (1997). Adenovirus-mediated transfer of a functional GAD gene into nerve cells: potential for the treatment of neurological diseases. *Gene Ther*, 4(11), 1237-1245.
- Robertson, R. T., Baratta, J., Kageyama, G. H., Ha, D. H., & Yu, J. (1997). Specificity of attachment and neurite outgrowth of dissociated basal forebrain cholinergic neurons seeded on to organotypic slice cultures of forebrain. *Neuroscience*, 80(3), 741-752.
- Rodriguez-Moreno, A., & Lerma, J. (1998). Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*, 20(6), 1211-1218.
- Rolls, E. T. (2007). An attractor network in the hippocampus: theory and neurophysiology. *Learn Mem*, 14(11), 714-731.
- Romøren, K., Thu, B. J., Bols, N. C., & Evensen, O. (2004). Transfection efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in salmonid cell lines of hepatocyte and macrophage origin. *Biochim Biophys Acta*, 1663(1-2), 127-134.
- Ross, R. T., Orr, W. B., Holland, P. C., & Berger, T. W. (1984). Hippocampectomy disrupts acquisition and retention of learned conditional responding. *Behav Neurosci*, 98(2), 211-225.
- Ruiz, A., Sachidhanandam, S., Utvik, J. K., Coussen, F., & Mulle, C. (2005). Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci*, 25(50), 11710-11718.
- Rundfeldt, C. (1997). The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells. *Eur J Pharmacol*, 336(2-3), 243-249.
- Russo, E., & Constanti, A. (2004). Topiramate hyperpolarizes and modulates the slow poststimulus AHP of rat olfactory cortical neurones in vitro. *Br J Pharmacol*, 141(2), 285-301.
- Sabatier, N., Brown, C. H., Ludwig, M., & Leng, G. (2004). Phasic spike patterning in rat supraoptic neurones in vivo and in vitro. *J Physiol*, 558(Pt 1), 161-180.
- Sah, P. (1995). Different calcium channels are coupled to potassium channels with distinct physiological roles in vagal neurons. *Proc Biol Sci*, 260(1357), 105-111.
- Sah, P., & Bekkers, J. M. (1996). Apical dendritic location of slow afterhyperpolarization current in hippocampal pyramidal neurons: implications for the integration of long-term potentiation. *J Neurosci*, 16(15), 4537-4542.
- Sah, P., & Clements, J. D. (1999). Photolytic manipulation of [Ca²⁺]_i reveals slow kinetics of potassium channels underlying the afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 19(10), 3657-3664.
- Sah, P., & Faber, E. S. (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol*, 66(5), 345-353.
- Sah, P., & McLachlan, E. M. (1991). Ca(2⁺)-activated K⁺ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca(2⁺)-activated Ca²⁺ release. *Neuron*, 7(2), 257-264.

- Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70(4), 582-588.
- Santi, C. M., Ferreira, G., Yang, B., Gazula, V. R., Butler, A., Wei, A., . . . Salkoff, L. (2006). Opposite regulation of Slick and Slack K⁺ channels by neuromodulators. *J Neurosci*, 26(19), 5059-5068.
- Sato, Y., Shiraishi, Y., & Furuichi, T. (2004). Cell specificity and efficiency of the Semliki forest virus vector- and adenovirus vector-mediated gene expression in mouse cerebellum. *J Neurosci Methods*, 137(1), 111-121.
- Scharfman, H. E. (1992). Differentiation of rat dentate neurons by morphology and electrophysiology in hippocampal slices: granule cells, spiny hilar cells and aspiny 'fast-spiking' cells. *Epilepsy Res Suppl*, 7, 93-109.
- Scharfman, H. E., & Bernstein, H. L. (2015). Potential implications of a monosynaptic pathway from mossy cells to adult-born granule cells of the dentate gyrus. *Front Syst Neurosci*, 9, 112.
- Scharfman, H. E., & Myers, C. E. (2012). Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front Neural Circuits*, 6, 106.
- Scharfman, H. E., Sollas, A. L., Berger, R. E., & Goodman, J. H. (2003). Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *J Neurophysiol*, 90(4), 2536-2547.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., & Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), 184-187.
- Scholz, A. (2002). Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth*, 89(1), 52-61.
- Scholz, A., & Vogel, W. (2000). Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain*, 89(1), 47-52.
- Schwarzer, C., Tsunashima, K., Wanzenböck, C., Fuchs, K., Sieghart, W., & Sperk, G. (1997). GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 80(4), 1001-1017.
- Schwindt, P. C., Spain, W. J., & Crill, W. E. (1989). Long-lasting reduction of excitability by a sodium-dependent potassium current in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol*, 61(2), 233-244.
- Schwindt, P. C., Spain, W. J., & Crill, W. E. (1992). Effects of intracellular calcium chelation on voltage-dependent and calcium-dependent currents in cat neocortical neurons. *Neuroscience*, 47(3), 571-578.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Selke, K., Muller, A., Kukley, M., Schramm, J., & Dietrich, D. (2006). Firing pattern and calbindin-D28k content of human epileptic granule cells. *Brain Res*, 1120(1), 191-201.
- Shah, M., & Haylett, D. G. (2000a). Ca(2⁺) channels involved in the generation of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 83(5), 2554-2561.
- Shah, M., & Haylett, D. G. (2000b). The pharmacology of hSK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in mammalian cell lines. *Br J Pharmacol*, 129(4), 627-630.
- Shah, M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 544(Pt 1), 29-37.
- Shah, M. M., Javadzadeh-Tabatabaie, M., Benton, D. C., Ganellin, C. R., & Haylett, D. G. (2006). Enhancement of hippocampal pyramidal cell excitability by the novel

- selective slow-afterhyperpolarization channel blocker 3-(triphenylmethylaminomethyl)pyridine (UCL2077). *Mol Pharmacol*, 70(5), 1494-1502.
- Shah, M. M., Miscony, Z., Javadzadeh-Tabatabaie, M., Ganellin, C. R., & Haylett, D. G. (2001). Clotrimazole analogues: effective blockers of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *Br J Pharmacol*, 132(4), 889-898.
- Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L., & Snyder, P. W. (2007). Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol*, 35(7), 984-999.
- Shyng, S., Ferrigni, T., & Nichols, C. G. (1997). Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol*, 110(6), 643-654.
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24-45.
- Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., . . . Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet*, 18(1), 25-29.
- Skaggs, W. E., McNaughton, B. L., Wilson, M. A., & Barnes, C. A. (1996). Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus*, 6(2), 149-172.
- Sloviter, R. S. (1987). Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 235(4784), 73-76.
- Smith, R. L., Traul, D. L., Schaack, J., Clayton, G. H., Staley, K. J., & Wilcox, C. L. (2000). Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *J Virol*, 74(23), 11254-11261.
- Soh, H., & Tzingounis, A. V. (2010). The specific slow afterhyperpolarization inhibitor UCL2077 is a subtype-selective blocker of the epilepsy associated KCNQ channels. *Mol Pharmacol*, 78(6), 1088-1095.
- Spigelman, I., Zhang, L., & Carlen, P. L. (1992). Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices: membrane excitability and K⁺ currents. *J Neurophysiol*, 68(1), 55-69.
- Spruston, N., & Johnston, D. (1992). Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 67(3), 508-529.
- Spruston, N., & McBain, C. (2006). Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. In P. Andersen, R. G. Morris, D. G. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The Hippocampus Book*. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Staley, K. J., & Mody, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol*, 68(1), 197-212.
- Staley, K. J., Otis, T. S., & Mody, I. (1992). Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol*, 67(5), 1346-1358.
- Stegen, M., Kirchheim, F., Hanuschkin, A., Staszewski, O., Veh, R. W., & Wolfart, J. (2012). Adaptive intrinsic plasticity in human dentate gyrus granule cells during temporal lobe epilepsy. *Cereb Cortex*, 22(9), 2087-2101.
- Stegen, M., Young, C. C., Haas, C. A., Zentner, J., & Wolfart, J. (2009). Increased leak conductance in dentate gyrus granule cells of temporal lobe epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia*, 50(4), 646-653.

- Stocker, M., Krause, M., & Pedarzani, P. (1999). An apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4662-4667.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37(2), 173-182.
- Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 385, 733-759.
- Storm, J. F. (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*, 409, 171-190.
- Storm, J. F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res*, 83, 161-187.
- Striggo, F., & Ehrlich, B. E. (1996). Ligand-gated calcium channels inside and out. *Curr Opin Cell Biol*, 8(4), 490-495.
- Suh, B. C., Horowitz, L. F., Hirdes, W., Mackie, K., & Hille, B. (2004). Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq. *J Gen Physiol*, 123(6), 663-683.
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., & Ramirez, L. (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*, 26(3), 321-330.
- Suzuki, F., Junier, M. P., Guilhem, D., Sorensen, J. C., & Onteniente, B. (1995). Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 64(3), 665-674.
- Szirmai, I., Buzsaki, G., & Kamondi, A. (2012). 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*, 22(7), 1508-1516.
- Tanabe, M., Gahwiler, B. H., & Gerber, U. (1998). L-Type Ca^{2+} channels mediate the slow Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarization current in rat CA3 pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol*, 80(5), 2268-2273.
- Tanner, G. R., Lutas, A., Martinez-Francois, J. R., & Yellen, G. (2011). Single K ATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. *J Neurosci*, 31(23), 8689-8696.
- Tate, D. F., & Bigler, E. D. (2000). Fornix and hippocampal atrophy in traumatic brain injury. *Learn Mem*, 7(6), 442-446.
- Tellez-Zenteno, J. F., & Hernandez-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Treat*, 2012, 630853.
- Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Yang, S. M., Trincherro, M. F., Alvarez, D. D., Kropff, E., . . . Schinder, A. F. (2015). Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron*, 85(1), 116-130.
- Thibault, O., & Landfield, P. W. (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science*, 272(5264), 1017-1020.
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40(5), 520-543.
- Thom, M., Liagkouras, I., Elliot, K. J., Martinian, L., Harkness, W., McEvoy, A., . . . Sisodiya, S. M. (2010). Reliability of patterns of hippocampal sclerosis as predictors of postsurgical outcome. *Epilepsia*, 51(9), 1801-1808.
- Tinker, A., Aziz, Q., & Thomas, A. (2014). The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*, 171(1), 12-23.

- Toescu, E. C., & Verkhratsky, A. (2007). The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. *Aging Cell*, 6(3), 267-273.
- Tombaugh, G. C., Rowe, W. B., & Rose, G. M. (2005). The slow afterhyperpolarization in hippocampal CA1 neurons covaries with spatial learning ability in aged Fisher 344 rats. *J Neurosci*, 25(10), 2609-2616.
- Traub, R. D., & Wong, R. K. (1982). Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy. *Science*, 216(4547), 745-747.
- Treves, A., & Rolls, E. T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3), 374-391.
- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, 154(4), 1155-1172.
- Turner, R. W., Asmara, H., Engbers, J. D., Miclat, J., Rizwan, A. P., Sahu, G., & Zamponi, G. W. (2016). Assessing the role of IKCa channels in generating the sAHP of CA1 hippocampal pyramidal cells. *Channels (Austin)*, 10(4), 313-319.
- Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol*, 90(5), 2964-2972.
- Tzingounis, A. V., Kobayashi, M., Takamatsu, K., & Nicoll, R. A. (2007). Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, 53(4), 487-493.
- Tzingounis, A. V., & Nicoll, R. A. (2008). Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50), 19974-19979.
- Undrovinas, A. I., Burnashev, N., Eroshenko, D., Fleidervish, I., Starmer, C. F., Makielski, J. C., & Rosenshtraukh, L. V. (1990). Quinidine blocks adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels in heart. *Am J Physiol*, 259(5 Pt 2), H1609-1612.
- van de Vrede, Y., Fossier, P., Baux, G., Joels, M., & Chameau, P. (2007). Control of IsAHP in mouse hippocampus CA1 pyramidal neurons by RyR3-mediated calcium-induced calcium release. *Pflugers Arch*, 455(2), 297-308.
- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030-1034.
- Vanderwolf, C. H., & Cain, D. P. (1994). The behavioral neurobiology of learning and memory: a conceptual reorientation. *Brain Res Brain Res Rev*, 19(3), 264-297.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 36(1), 1-22.
- Veena, J., Rao, B. S., & Srikumar, B. N. (2011). Regulation of adult neurogenesis in the hippocampus by stress, acetylcholine and dopamine. *J Nat Sci Biol Med*, 2(1), 26-37.
- Velumian, A. A., Zhang, L., Pennefather, P., & Carlen, P. L. (1997). Reversible inhibition of IK, IAHP, Ih and ICa currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones. *Pflugers Arch*, 433(3), 343-350.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., & Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, 8(3), 321-329.
- Vida, I. (2009). 'Leaky' neurons in the epileptic hippocampus: should we get excited? *J Physiol*, 587(Pt 17), 4127-4128.

- Vilchis, C., Bargas, J., Ayala, G. X., Galvan, E., & Galarraga, E. (2000). Ca²⁺ channels that activate Ca²⁺-dependent K⁺ currents in neostriatal neurons. *Neuroscience*, 95(3), 745-752.
- Villalobos, C., & Andrade, R. (2010). Visinin-like neuronal calcium sensor proteins regulate the slow calcium-activated afterhyperpolarizing current in the rat cerebral cortex. *J Neurosci*, 30(43), 14361-14365.
- Villalobos, C., Foehring, R. C., Lee, J. C., & Andrade, R. (2011). Essential role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the expression, regulation, and gating of the slow afterhyperpolarization current in the cerebral cortex. *J Neurosci*, 31(50), 18303-18312.
- Villalobos, C., Shakkottai, V. G., Chandy, K. G., Michelhaugh, S. K., & Andrade, R. (2004). SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *J Neurosci*, 24(14), 3537-3542.
- Vogalis, F., Harvey, J. R., & Furness, J. B. (2003a). PKA-mediated inhibition of a novel K⁺ channel underlies the slow after-hyperpolarization in enteric AH neurons. *J Physiol*, 548(Pt 3), 801-814.
- Vogalis, F., Storm, J. F., & Lancaster, B. (2003b). SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci*, 18(12), 3155-3166.
- von Campe, G., Spencer, D. D., & de Lanerolle, N. C. (1997). Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus*, 7(5), 472-488.
- Wallen, P., Robertson, B., Cangiano, L., Low, P., Bhattacharjee, A., Kaczmarek, L. K., & Grillner, S. (2007). Sodium-dependent potassium channels of a Slack-like subtype contribute to the slow afterhyperpolarization in lamprey spinal neurons. *J Physiol*, 585(Pt 1), 75-90.
- Walther, W., & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60(2), 249-271.
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., . . . McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, 282(5395), 1890-1893.
- Wang, K., Mateos-Aparicio, P., Honigsperger, C., Raghuram, V., Wu, W. W., Ridder, M. C., . . . Adelman, J. P. (2016). IK1 channels do not contribute to the slow afterhyperpolarization in pyramidal neurons. *Elife*, 5, e11206.
- Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29(28), 9090-9103.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., & Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 463-472.
- Whetsell, W. O., Jr., Mytilineou, C., Shen, J., & Yahr, M. D. (1981). The development of the dog nigrostriatal system in organotypic culture. *J Neural Transm*, 52(3), 149-161.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790), 1093-1097.
- Wickenden, A. D., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., & Wagoner, P. K. (2000). Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol*, 58(3), 591-600.
- Wickenden, A. D., Zou, A., Wagoner, P. K., & Jegla, T. (2001). Characterization of KCNQ5/Q3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Br J Pharmacol*, 132(2), 381-384.

- Winks, J. S., Hughes, S., Filippov, A. K., Tatulian, L., Abogadie, F. C., Brown, D. A., & Marsh, S. J. (2005). Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci*, 25(13), 3400-3413.
- Witter, M. P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163, 43-61.
- Wittner, L., Magloczky, Z., Borhegyi, Z., Halasz, P., Toth, S., Eross, L., . . . Freund, T. F. (2001). Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, 108(4), 587-600.
- Wolfart, J., & Laker, D. (2015). Homeostasis or channelopathy? Acquired cell type-specific ion channel changes in temporal lobe epilepsy and their antiepileptic potential. *Front Physiol*, 6, 168.
- Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., & Roeper, J. (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci*, 21(10), 3443-3456.
- Womble, M. D., & Moises, H. C. (1993). Muscarinic modulation of conductances underlying the afterhyperpolarization in neurons of the rat basolateral amygdala. *Brain Res*, 621(1), 87-96.
- Wray, S., Castel, M., & Gainer, H. (1993). Characterization of the suprachiasmatic nucleus in organotypic slice explant cultures. *Microsc Res Tech*, 25(1), 46-60.
- Wright, S. H. (2004). Generation of resting membrane potential. *Adv Physiol Educ*, 28(1-4), 139-142.
- Wyler, A. R., Curtis Dohan, F., Schweitzer, J. B., & Berry, A. D. (1992). A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *Journal of Epilepsy*, 5(4), 220-225.
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P. P., Manzana, W., Zhu, Y., . . . Cobb, R. R. (2006). High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expr Purif*, 45(1), 115-124.
- Yamada, K., Ji, J. J., Yuan, H., Miki, T., Sato, S., Horimoto, N., . . . Inagaki, N. (2001). Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science*, 292(5521), 1543-1546.
- Yan, K., Gao, L. N., Cui, Y. L., Zhang, Y., & Zhou, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol Med Rep*, 13(5), 3715-3723.
- Yang, B., Desai, R., & Kaczmarek, L. K. (2007). Slack and Slick K(Na) channels regulate the accuracy of timing of auditory neurons. *J Neurosci*, 27(10), 2617-2627.
- Yang, B., Gribkoff, V. K., Pan, J., Damagnez, V., Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., . . . Kaczmarek, L. K. (2006). Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels. *Neuropharmacology*, 51(4), 896-906.
- Yang, H., Guo, R., Wu, J., Peng, Y., Xie, D., Zheng, W., . . . Song, Z. (2013). The antiepileptic effect of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose is mediated by upregulation of K(ATP) channel subunits Kir6.1 and Kir6.2. *Neurochem Res*, 38(4), 677-685.
- Yarishkin, O., Lee, D. Y., Kim, E., Cho, C. H., Choi, J. H., Lee, C. J., . . . Park, J. Y. (2014). TWIK-1 contributes to the intrinsic excitability of dentate granule cells in mouse hippocampus. *Mol Brain*, 7, 80.
- Yim, M. Y., Hanuschkin, A., & Wolfart, J. (2015). Intrinsic rescaling of granule cells restores pattern separation ability of a dentate gyrus network model during epileptic hyperexcitability. *Hippocampus*, 25(3), 297-308.

- Ylinen, A., Soltesz, I., Bragin, A., Penttonen, M., Sik, A., & Buzsaki, G. (1995). Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5(1), 78-90.
- Yost, C. S. (1999). Potassium channels: basic aspects, functional roles, and medical significance. *Anesthesiology*, 90(4), 1186-1203.
- Young, C. C., Stegen, M., Bernard, R., Muller, M., Bischofberger, J., Veh, R. W., . . . Wolfart, J. (2009). Upregulation of inward rectifier K⁺ (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Physiol*, 587(Pt 17), 4213-4233.
- Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z. W., Pollak, K., Nonet, M., . . . Salkoff, L. (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron*, 37(5), 765-773.
- Yue, C., & Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 24(19), 4614-4624.
- Zamponi, G. W., Bourinet, E., & Snutch, T. P. (1996). Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol*, 151(1), 77-90.
- Zawar, C., Plant, T. D., Schirra, C., Konnerth, A., & Neumcke, B. (1999). Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol*, 514 (Pt 2), 327-341.
- Zaydman, M. A., & Cui, J. (2014). PIP2 regulation of KCNQ channels: biophysical and molecular mechanisms for lipid modulation of voltage-dependent gating. *Front Physiol*, 5, 195.
- Zhang, L., Doyon, W. M., Clark, J. J., Phillips, P. E., & Dani, J. A. (2009a). Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. *Mol Pharmacol*, 76(2), 396-404.
- Zhang, L., Kolaj, M., & Renaud, L. P. (2010). Ca²⁺-dependent and Na⁺-dependent K⁺ conductances contribute to a slow AHP in thalamic paraventricular nucleus neurons: a novel target for orexin receptors. *J Neurophysiol*, 104(4), 2052-2062.
- Zhang, L., & Krnjevic, K. (1993). Whole-cell recording of anoxic effects on hippocampal neurons in slices. *J Neurophysiol*, 69(1), 118-127.
- Zhang, L., Pennefather, P., Velumian, A., Tymianski, M., Charlton, M., & Carlen, P. L. (1995). Potentiation of a slow Ca²⁺-dependent K⁺ current by intracellular Ca²⁺ chelators in hippocampal CA1 neurons of rat brain slices. *J Neurophysiol*, 74(6), 2225-2241.
- Zhang, L., Renaud, L. P., & Kolaj, M. (2009b). Properties of a T-type Ca²⁺ channel-activated slow afterhyperpolarization in thalamic paraventricular nucleus and other thalamic midline neurons. *J Neurophysiol*, 101(6), 2741-2750.
- Zhang, L., Weiner, J. L., Valiante, T. A., Velumian, A. A., Watson, P. L., Jahromi, S. S., . . . Carlen, P. L. (1994). Whole-cell recording of the Ca²⁺-dependent slow afterhyperpolarization in hippocampal neurons: effects of internally applied anions. *Pflugers Arch*, 426(3-4), 247-253.
- Zhang, Q., Zhou, P., Chen, Z., Li, M., Jiang, H., Gao, Z., & Yang, H. (2013). Dynamic PIP2 interactions with voltage sensor elements contribute to KCNQ2 channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20093-20098.
- Zhang, Y., Satterlee, A., & Huang, L. (2012). In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol Ther*, 20(7), 1298-1304.
- Zhang, Z. W. (2004). Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *J Neurophysiol*, 91(3), 1171-1182.
- Zimmer, J., & Gähwiler, B. H. (1984). Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol*, 228(3), 432-446.

- Zubaran, C., Fernandes, J. G., & Rodnight, R. (1997). Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad Med J*, 73(855), 27-31.
- Zweers, M. C., Davidson, J. M., Pozzi, A., Hallinger, R., Janz, K., Quondamatteo, F., . . . Eckes, B. (2007). Integrin alpha2beta1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. *J Invest Dermatol*, 127(2), 467-478.

VII. Danksagung

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei meinem Projekt und der Verfassung dieser Arbeit tatkräftig oder auch seelisch unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Dr. Jakob Wolfart für das interessante Projekt, die Einarbeitungen in die Patch-Clamp-Technik und die fachliche Unterstützung. Vor allem bedanke ich mich auch für die Entscheidung mich nach einem Jahr von Freiburg mit nach Rostock zu nehmen, welche sich für mein Leben als sehr bedeutsam erwies.

Ich danke Herrn Prof. Köhling für die Möglichkeit an seinem Institut unter den besten Bedingungen weiter an meinem Projekt arbeiten zu können. PD Dr. Timo Kirschstein danke ich für die Planung der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit und wertvolle Tipps.

Für die praktische Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit in diesem Projekt danke ich Anne Lehmann, Steffen Müller, Hanka Schmidt, Katrin Porath und Tina Sellmann, die sich alle mit großem Interesse meinem Projekt widmeten und die ein oder anderen zeitaufreibenden Aufgaben übernahmen. Tina Sellmann danke ich vor allem auch für das Korrekturlesen.

Andreas Prestel und Bernd Memmner danke ich für die Unterstützung bei technischen Problemen und für die individuellen Modifizierungen des Patch-Clamp-Set-Ups und anderer Utensilien, die für meine Experimente maßgeblich waren.

Ich danke auch Frau Mandy Riedel, die mir immer sehr freundlich und fürsorglich entgegenkam.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich vor allem für die schöne Zeit neben der Arbeit und für aufbauende Worte in schwierigen Zeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei Tina und Burkhard Brands, die mir zum Ende meiner Arbeit ein schönes Zuhause und mit netten Gesprächen Abwechslung in meiner Schreibphase bescherten.

Mein besonderer Dank geht an Matthias Brands, der immer an mich glaubte, mich stets unterstützte und mein Leben bereichert.